

**Beurteilung der maschinellen Parameter der  
Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV bei Katzen**

von Leni Kristin Hoffmann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Beurteilung der maschinellen Parameter der  
Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV bei Katzen**

von Leni Kristin Hoffmann

aus Pforzheim

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

**Tag der Promotion:  
29. Juli 2017**

Meiner Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Ermittlung und Bedeutung der Retikulozyten und ihrer Parameter .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Retikulozyten und ihre Parameter .....	3
1.1.1.	Manuelle Auszählung .....	3
1.1.2.	Maschinelle Auszählung des Sysmex XT-2000iV .....	4
1.1.3.	Bedeutung der Immaturen Retikulozytenfraktion.....	5
<b>2.</b>	<b>Einteilung der Anämieformen und Beurteilung ihrer Retikulozytenzahlen und Retikulozytenparameter .....</b>	<b>7</b>
2.1.	Regenerative Anämie .....	9
2.1.1.	Hämolytische Anämie .....	10
2.1.1.1.	Immunmedierte hämolytische Anämie .....	11
2.1.1.1.1.	Primär immunmedierte hämolytische Anämie .....	12
2.1.1.1.2.	Sekundär immunmedierte hämolytische Anämie .....	13
2.1.1.2.	Blutgruppen-bedingte hämolytische Anämie.....	14
2.1.1.3.	Blutparasiten .....	16
2.1.1.3.1.	Ehrlichien .....	16
2.1.1.3.2.	Hämotrophe Mykoplasmen .....	16
2.1.1.3.3.	Babesiose .....	17
2.1.1.3.4.	Cytauxzoonose .....	18
2.1.1.4.	Metabolisch bedingte hämolytische Anämie .....	19
2.1.1.5.	Hereditäre Erythrozytendefekte .....	20
2.1.1.5.1.	Cytochrom-b5-Reduktase-Defizienz .....	20
2.1.1.5.2.	Pyruvatkinase-Defizienz .....	20
2.1.1.5.3.	Membrandefekte .....	21
2.1.1.5.4.	Porphyrie .....	22
2.1.1.6.	Oxidativ bedingte hämolytische Anämien .....	22
2.1.1.6.1.	Diabetes mellitus mit/ohne Ketoazidose.....	23
2.1.1.6.2.	Hepatulipidose .....	23
2.1.1.6.3.	Arzneimittel, Chemikalien und Futtermittelzusatzstoffe .....	24
2.1.1.7.	Osmotisch bedingte hämolytische Anämie.....	24
2.1.1.8.	Mechanisch bedingte hämolytische Anämie.....	25

2.1.1.8.1.	Disseminierte intravasale Gerinnung.....	25
2.1.1.8.2.	Hämangiosarkom .....	25
2.1.1.8.3.	Caval Syndrom.....	26
2.1.1.8.4.	Mikroangiopathische, hämolytische Anämie.....	26
2.1.1.9.	Anämie durch Hämolysine.....	26
2.1.1.9.1.	Bakterielle Hämolysine .....	26
2.1.1.9.2.	Tierische Hämolysine .....	27
2.1.1.9.3.	Chemische Hämolysine.....	27
2.1.1.10.	Hypersplenismus .....	27
2.1.2.	Blutungsanämie.....	28
2.1.2.1.	Akute Blutungsanämie.....	28
2.1.2.2.	Chronische Blutungsanämie (Eisenmangelanämie).....	29
2.2.	Aregenerative Anämie .....	31
2.2.1.	Pseudoaregenerative Anämie.....	31
2.2.2.	Extramedullär bedingte aregenerative Anämie.....	31
2.2.2.1.	Anämie der chronischen / entzündlichen Erkrankungen .....	32
2.2.2.2.	Erythropoetinmangel.....	33
2.2.2.2.1.	Anämien bei chronischen Nierenerkrankungen.....	33
2.2.2.2.2.	Fehlender Einfluss von Hormonen .....	34
2.2.2.3.	Anämie durch Mangelzustände.....	34
2.2.2.3.1.	Vitaminmangel.....	35
2.2.2.3.2.	Mangel an Spurenelementen .....	35
2.2.3.	Medullär bedingte aregenerative Anämie .....	36
2.2.3.1.	Isolierte Anämie .....	36
2.2.3.1.1.	Anämie der erythroiden Hypo-/Aplasie.....	36
2.2.3.1.2.	Aregenerative immunmedierte hämolytische Anämie.....	37
2.2.3.1.3.	Dyserythropoese .....	37
2.2.3.2.	Anämie mit Leukopenie und/oder Thrombozytopenie .....	38
2.2.3.2.1.	Infektionen .....	39
2.2.3.2.2.	Toxine .....	40
2.2.3.2.3.	Strahlung .....	41
2.2.3.2.4.	Myelodysplastisches Syndrom.....	41
2.2.3.2.5.	Sekundäre Dysmyelopoese .....	42
2.2.3.2.6.	Knochenmarktumor .....	42
2.2.3.2.7.	Myelophthistische Anämie .....	45

<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>47</b>
1. Blutproben .....	47
2. Manuelle Auszählung .....	49
3. Maschinelle Auszählung des Sysmex XT-2000iV.....	50
4. Statistik .....	51
<b>IV. ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
1. Evaluation der maschinellen im Vergleich mit der manuellen Retikulozytenzählung anämischer Katzen .....	55
2. Der zufällige Messfehler – die Präzision.....	61
3. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der Retikulozytenzahl.	61
4. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der IRF.....	63
5. Wertebereiche von Parametern der Retikulozytenanalytik .....	64
6. Retikulozytose bei nicht anämischen Katzen .....	65
<b>V. DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
1. Evaluation der maschinellen im Vergleich mit der manuellen Retikulozytenzählung anämischer Katzen .....	69
2. Der zufällige Messfehler – die Präzision.....	71
3. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der Retikulozytenzahl.	73
4. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der IRF.....	73
5. Wertebereiche von Parametern der Retikulozytenanalytik .....	75
6. Retikulozytose bei nicht anämischen Katzen .....	78
7. Schlussfolgerung .....	86
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>VII. SUMMARY</b> .....	<b>89</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>91</b>
<b>IX. DANKSAGUNG</b> .....	<b>129</b>





## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Maßangaben:

ml/kg	Milliliter pro Kilogramm
µl	Mikroliter
%	Prozent

### Sonderzeichen:

®	registered Trademark (registrierte Warenmarke)
---	--

### Abkürzungen:

ATP	Adenosin-Triphosphat
CI	Confidence Interval (Konfidenzintervall)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coefficient of Variation (Variationskoeffizient)
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation (Disseminierte Intravasale Gerinnung)
DNA	Desoxyrubinukleinsäure
D.m.	Diabetes mellitus
eBFU	erythroide Burst-bildende Einheit
eCFU	erythroide Kolonie-bildende Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
et al. et alii	(und andere)
Fe 2+	reduziertes Eisen
FECV	Felines enterales Coronavirus
FeLV	Felines Leukämievirus
FIP	Feline Infektiöse Peritonitis
FIV	Felines Immunschwächevirus
HA	Hämolytische Anämie
HB	Heinzbodies
HCT	Hämatokrit
HFR	High Fluorescence Ratio (Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil)
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
IMHA	Immunmedierte hämolytische Anämie
IRF	Immature Reticulocyte Fraction (Immature Retikulozytenfraktion)
ISLH	International Society for Laboratory Hematology
κ	Cohen's Kappa Koeffizient
LFR	Low Fluorescence Ratio (Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration

	(Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt in einem Erythrozyten)
MCHC	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten)
MCV	Mean Corpuscular Volume (Mittleres Erythrozytenvolumen)
MFR	Middle Fluorescence Ratio (Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil)
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
P	Signifikanz
PK	Pyruvatkinase
pIMHA	Primär immunmedierte hämolytische Anämie
PLT	Platelets (Thrombozyten)
PLT-O	Fluoreszenz-optisch gemessene Thrombozyten
PRCA	Pure Red Cell Aplasia (Aplasie der Erythrozyten)
RA	Refraktäre Anämie
RARS	Refraktäre Anämie mit Ring-Sideroblasten
RAEB	Refraktäre Anämie mit Überschuss an Blasten
RAEB in T	RAEB in Transformation
RBC	Red Blood Cells (Erythrozyten)
RDW	Red Cell Distribution Width (Erythrozytenverteilungsbreite)
RDW-CV	Red Cell Distribution Width, Coefficient of Variation
RDW-SD	Red Cell Distribution Width, Standard Deviation
ROC-Kurve	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve
RET	Retikulozyten
RET-He	Reiculocyte haemoglobin equivalent (Retikulozyten-Hämoglobin-Äquivalent)
RNA	Ribonukleinsäure
sIMHA	Sekundär immunmedierte hämolytische Anämie
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
V. a.	Verdacht auf
Z. B.	Zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

Bei einem physiologisch hydrierten Patienten liegt charakteristischerweise eine Anämie vor, wenn Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozyten erniedrigt sind (BARGER, 2003). Die Anämie ist ein häufig gesehenes und komplexes Beschwerdebild bei Katzen (EVANS und GRUFFYDD-JONES, 1984). Die Retikulozytenzählung ist der Standard, um eine Anämie in eine regenerative oder aregenerative Anämie zu unterteilen (RILEY et al., 2001). Das Vorliegen einer Retikulozytose klassifiziert eine Anämie als regenerativ. Seit den 1940er Jahren verwendet man hierfür als Goldstandard die manuelle Methode, bei der die Retikulozyten angefärbt und mikroskopisch untersucht werden (RILEY et al., 2001; COWGILL et al., 2003). Aufgrund der Personal- und Zeitintensität dieser Methode gewinnen die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik zunehmend an Bedeutung. In der Humanmedizin haben sich diese neuen maschinellen Parameter bereits etabliert und stellen einen Zugewinn in der Diagnostik und Therapie der zahlreichen Anämieformen dar (TORRES GOMEZ et al., 2003; RAJA-SABUDIN et al., 2014; RAUF et al., 2016).

Der Schwerpunkt dieser Dissertation bezieht sich auf den Methodenvergleich zwischen der manuellen und maschinellen Retikulozytenzählung. Drei Studien haben sich bereits mit diesem Thema und der damit verbundenen Validierung des Blutanalysegerätes Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) befasst. Anders als in diesen drei Studien (LILLIEHOOK und TVEDTEN, 2009; WEISSENBACHER et al., 2011; BAUER et al., 2012) soll sich der Methodenvergleich auf anämische Katzen fokussieren.

Die Ziele des Methodenvergleichs mit Fokus auf anämische Katzen waren:

- die Evaluation der maschinellen Retikulozytenparameter des Sysmex XT-2000iV im Vergleich zu der manuellen Retikulozytenzählung,
- die Bestimmung der Präzision der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV,
- die Evaluation der Anämieklassifizierung in regenerativ und aregenerativ auf Basis der Retikulozytenzahl und der IRF.

Ein zusätzlicher retrospektiver Teil dieser Dissertation soll sich auf nicht anämische Katzen einer repräsentativen Klinikpopulation fokussieren, da die Bedeutung von Retikulozytenwerten ohne Vorliegen einer Anämie von zunehmendem Interesse ist (PATTULLO et al., 2015; FUCHS et al., 2016).

Die Ziele der Untersuchungen mit Fokus auf nicht anämische Katzen waren:

- die Ermittlung von Wertebereichen für die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV,
- die Bestimmung der Prävalenz und der möglichen Ätiopathogenesen einer Retikulozytose ohne Anämie.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Ermittlung und Bedeutung der Retikulozyten und ihrer Parameter**

#### **1.1. Retikulozyten und ihre Parameter**

Retikulozyten sind unreife Erythrozyten, die sich aus Metarubrizyten entwickeln, nachdem ihr pyknotischer Zellkern ausgestoßen wurde. Während dieses Reifungsprozesses nimmt der Gehalt an Ribonukleinsäure (RNA) und Zellorganellen innerhalb des Zytoplasmas ab (RILEY et al., 2001). Diese erythrozytären Vorläuferzellen werden aufgrund ihrer in der Supravitalfärbung netzförmig erscheinenden zytoplasmatischen RNA-Reste als Retikulozyt (reticulum = kleines Netz) bezeichnet (SATO et al., 2010).

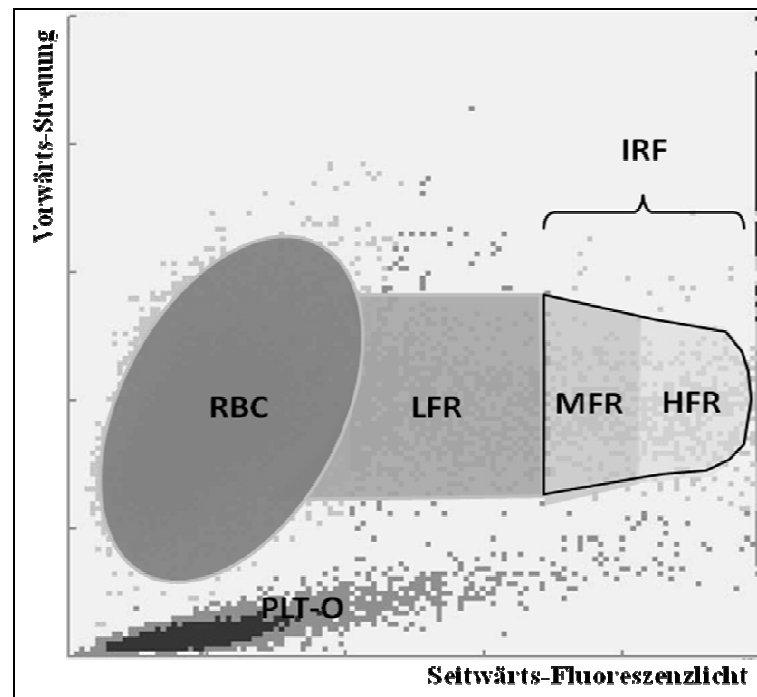
##### **1.1.1. Manuelle Auszählung**

Für die Untersuchung erythrozytärer Vorläuferzellen werden seit den 1940er Jahren Blutausstriche mit Supravitalfärbung angefärbt und mikroskopisch untersucht (BRECHER, 1949). Die manuelle Auszählung von Retikulozyten wird als Goldstandard zur Einteilung der Anämie in regenerativ und aregenerativ verwendet (RILEY et al., 2001; COWGILL et al., 2003). Die Katze weist die Besonderheit auf, dass bei der Erythropoese sowohl die aggregierten Retikulozyten mit netzförmigen RNA-Resten als auch punktierte Retikulozyten anzutreffen sind. Die aggregierten Retikulozyten, welche direkt aus dem Knochenmark entlassen werden, sind für die Interpretation der frühen Regeneration heranzuziehen und sollten ausschließlich bei der Retikulozytenzählung berücksichtigt werden (PERKINS et al., 1995). In dem peripheren Blut von Katzen liegt bei einem regenerationsfähigen Knochenmark nach frühestens drei Tagen eine Retikulozytose vor, und vier bis sechs Tage nach dem Beginn der Anämie erreichen die aggregierten Retikulozyten ihren Höchstwert (TVEDTEN, 1999). Die punktierten Retikulozyten hingegen können den momentanen Zustand des Knochenmarks nicht angemessen widerspiegeln, da sie sich nach zwölf bis vierundzwanzig Stunden aus den aggregierten Retikulozyten entwickeln und ungefähr zehn Tage im peripheren Blut verbleiben (REAGAN et al., 1992).

### 1.1.2. Maschinelle Auszählung des Sysmex XT-2000iV

In der Tiermedizin gewinnt die maschinelle Auszählung der Retikulozyten mit Hilfe von maschinellen Hämatologie-Analysegeräten zunehmend an Bedeutung (LILLIEHOOK und TVEDTEN, 2009). Für die Einteilung der Anämie werden von den maschinellen Blutanalysegeräten routinemäßig folgende Retikulozytenparameter analysiert: Retikulozyten (Absolut- und Relativzahl), Immature Retikulozytenfraktion (IRF), Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil (LFR), Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil (MFR) sowie Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil (HFR). Die von den Analysegeräten ebenfalls erfassten Erythrozytenindizes sind den Retikulozytenparametern unterlegen. So sind nach einer Studie bei Katzen die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC), der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt in einem Erythrozyten (MCH) und das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) nicht für die Anämieklassifizierung in regenerativ und aregenerativ geeignet (FURMAN et al., 2014).

Die Retikulozyten und ihre Parameter werden anhand des optischen Verfahrens der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und eines Halbleiter-Lasers gezählt. Fluoreszenzfarbstoffe können sich an die zytoplasmatische RNA von Zellen binden. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal kann mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zu dem RNA-Gehalt der Retikulozyten und gibt somit deren Reifezustand wieder (KOEPEKE, 1999). Retikulozyten entwickeln sich zu reifen Erythrozyten, indem ihre Zellgröße und ihr Gehalt an Ribonukleinsäure (RNA) abnimmt. Jüngere Retikulozyten haben einen höheren RNA-Gehalt und senden daher stärkere Fluoreszenzsignale aus als reifere Retikulozyten. Die Retikulozyten sind unter Berücksichtigung ihres RNA-Gehalts und ihrer Größe in drei Fraktionen unterteilt, die das Analysegerät Sysmex XT-2000iV anhand von Punktwolken in einem Schaubild darstellt. Das Retikulozyten-Scattergramm zeigt Retikulozyten mit geringem (LFR), mittlerem (MFR) und hohem (HFR) Fluoreszenzgehalt an. Die jungen Retikulozyten, die IRF, beinhalten die MFR und die HFR (CHANG und KASS, 1997) (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Retikulozyten-Scattergramms des Sysmex XT-2000iV einer anämischen Katze mit ausgeprägter Regeneration. RBC = Erythrozyten; LFR = Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil; MFR = Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil; HFR = Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil; PLT-O = Fluoreszenz-optisch gemessene Thrombozyten. Die Vorwärts-Streuung auf der y-Achse ist gegen das Seitwärts-Fluoreszenzlicht auf der x-Achse aufgetragen.

Der Mittelwert der Vorwärts-Streuung innerhalb der Retikulozytenpopulation gibt einen Y-Achsen Wert an, der durch mathematische Umrechnung die Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten widerspiegelt (FRANCK et al., 2004). Dieser letztgenannte Parameter wird als RET-He (Reticulocyte haemoglobin equivalent) bezeichnet. Er wird jedoch erst von Sysmex XN als Routineparameter angezeigt und nur durch eine zusätzliche Software (RET-Master) auch von Sysmex XT und XE zur Verfügung gestellt (BRUGNARA et al., 2006; BUTTARELLO, 2016).

### 1.1.3. Bedeutung der Immaturen Retikulozytenfraktion

Die Bedeutung der IRF als Hinweis auf eine beginnende Erythropoese ist bei der Katze momentan noch ungewiss. In der Humanmedizin dient die IRF nach aktuellem Kenntnisstand als Parameter für den Grad der Anämie, die Aktivität der Erythropoese, die Genesung des Knochenmarks nach Chemotherapie, Stammzell- oder Knochenmarktransplantationen, sowie den Therapieerfolg von Eisensubstitution oder rekombinanter Erythropoetin (EPO)-Substitution. Die IRF ist somit ein geeigneter Parameter, um die Anämie zu klassifizieren und den Verlauf zu kontrollieren, denn sie sagt frühzeitig die Knochenmarkantwort voraus



(NORONHA et al., 2003; GELDARD et al., 2009a; GONCALO et al., 2011; THOMAS et al., 2013; MORKIS et al., 2015; RAUF et al., 2016). Die IRF zeigt den Beginn der Erythropoese im Blut an und ein hoher Wert weist auf eine deutliche Stimulation hin. Je nach ermittelter IRF kann die Dauer einer vermehrten Ausschüttung von Retikulozyten aus dem Knochenmark eingeschätzt werden und zu einer Differenzierung zwischen erythrozytären Produktions- und Umsatzstörungen verhelfen. So erübrigt sich durch die IRF das zeitintensivere Berechnen eines Retikulozytenproduktionsindex, da beide die gleiche klinische Aussagekraft haben (PIVA et al., 2010). Zudem wird der Retikulozytenproduktionsindex bei Katzen in der Regel nicht angewandt, da bislang die Verweildauer der Retikulozyten je nach Schweregrad der Anämie nicht genau bestimmt ist (COWGILL et al., 2003).

Im Folgenden werden humanmedizinische Studien erläutert, die den Nutzen der IRF belegen. Die Möglichkeit, mithilfe der IRF die Knochenmarkaktivität zu beurteilen, hilft in der Humanmedizin, die verschiedenen Anämieformen zu differenzieren (WATANABE et al., 1994). Beispielsweise kann man anhand von IRF Werten  $> 16\%$  das Myelodysplastische Syndrom (MDS) von einer nicht-megaloblastischen, makrozytären Anämie unterscheiden (TORRES GOMEZ et al., 2003). In einer prospektiven Studie wurde bei 22 Patienten mit akuter Leukämie von Beginn der Chemotherapie bis zum Ansprechen auf die Chemotherapie jeden dritten Tag Blut abgenommen. Dieses wurde auf die absolute Neutrophilenzahl und auf die IRF untersucht. Bei 63 % der Patienten zeigte die IRF eine Knochenmarkgenesung im Mittel vier Tage früher an. Zudem reagierte die IRF im Gegensatz zur absoluten Neutrophilenzahl nicht anfällig auf Infektionen und war ein zuverlässigerer Parameter bei neutropenischen Patienten (RAJA-SABUDIN et al., 2014). In einer aktuellen Studie wurden bei 45 Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphatischer Leukämie, welche mit einer Chemotherapie behandelt wurden, von Tag eins bis zum Auftreten erster Regenerationsanzeichen an jedem zweiten Tag das Blut untersucht. Die IRF zeigte bei 88,9 % der Patienten durchschnittlich sechs Tage früher eine Regeneration des Blutbildes an, als dies bei der absoluten Neutrophilenzahl der Fall war (RAUF et al., 2016). In einer weiteren Studie wurden 44 Patienten untersucht, die eine allogene oder autologe Stammzelltransplantation erhielten. Auch hier erwies sich die IRF als frühester und stabilster Parameter, eine

Hämatopoese nach Ansprechen auf die Stammzelltransplantation aufzuzeigen. Die ebenfalls als Parameter untersuchte Fraktion der unreifen Blutblättchen dagegen zeigte Abweichungen, die möglicherweise eine Folge von Infektionen waren (MORKIS et al., 2015). Die IRF ist außerdem auch der früheste Parameter, der die Rekonstitution nach Knochenmarktransplantation anzeigt (NORONHA et al., 2003). Des Weiteren dient die IRF in der Humanmedizin als Therapiekontrolle bei Eisen- oder rekombinanter EPO-Substitution (THOMAS et al., 2013).

Es gibt nur wenige humanmedizinische Studien mit gerätespezifischen Referenzintervallen. Das Referenzintervall der IRF lag bei den 422 von Sysmex XT-2000i analysierten Blutproben bei 0,7–11,6 %. Das jeweilige Referenzintervall für die LFR betrug 88,4–99,3 %, für die MFR 0,7–10,5 % und für die HFR 0,0–1,5 % (BLAHA-KAPLANS, 2013).

## **2. Einteilung der Anämieformen und Beurteilung ihrer Retikulozytenzahlen und Retikulozytenparameter**

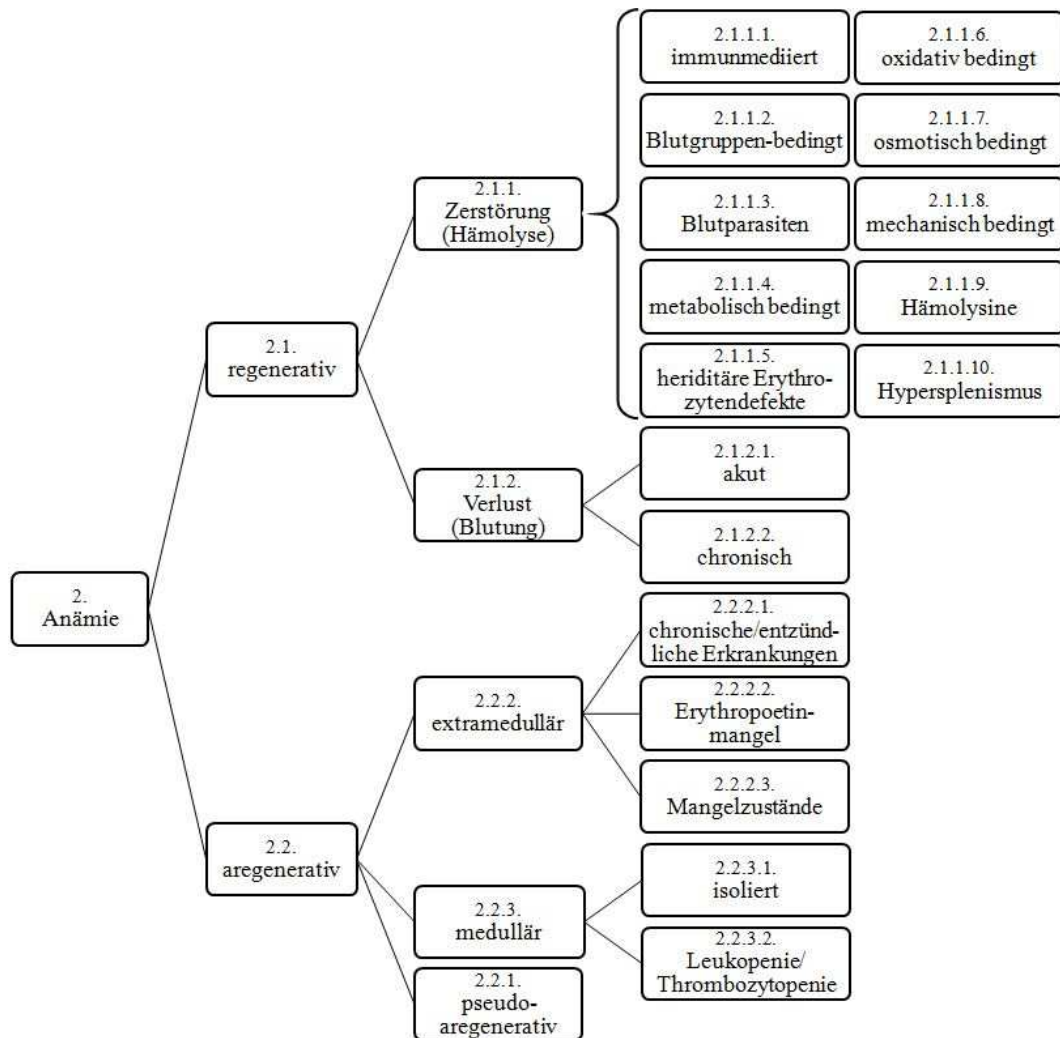
Die Anämie lässt sich in zwei klinisch bedeutsame Untergruppen unterteilen, welche die Knochenmarkantwort widerspiegeln. Die regenerative Anämie ist gekennzeichnet durch die Reaktion des Knochenmarks Vorläuferzellen zu produzieren. Die aregenerative Anämie hingegen zeigt keine oder ungenügende Regenerationsfähigkeit (COWGILL et al., 2003).

Liegt eine Retikulozytose in Zusammenhang mit einer Anämie vor, spricht dies für eine regenerative Anämie (RILEY et al., 2001). Ohne Vorliegen einer Anämie spricht die Retikulozytose für eine gesteigerte Erythropoese, deren Ätiopathogenese bei Hunden näher untersucht wurde (PATTULLO et al., 2015). Bei Katzen konnte diesbezüglich ausschließlich ein Abstract einer zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht veröffentlichten Multicenterstudie gefunden werden (FUCHS et al., 2016).

Je nach Literaturangabe werden unterschiedliche Cut-Off-Werte der absoluten aggregierten Retikulozytenzahlen für die Klassifizierung einer regenerativen Anämie verwendet. Die absolute Zahl der aggregierten Retikulozyten wird manuell ausgezählt, um anhand erhöhter Retikulozytenwerte auf eine Regeneration zu schließen (RILEY et al., 2001; COWGILL et al., 2003). Folgende obere Referenzwerte aggregierter Retikulozyten bei gesunden Katzen

sind in der Literatur beschrieben:  $15 \times 10^9$  (PERMAN und SCHALL, 1983),  $30 \times 10^9$  (MORITZ et al., 2014),  $40 \times 10^9$  (TVEDTEN und WEISS, 2000),  $50 \times 10^9$  (WHITE und REINE, 2009) und  $60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (KRAFT et al., 1999). Die Referenzbereiche der Retikulozytenanalytik maschineller Hämatologie-Analysegeräte sind in der Literatur für Katzen nur wenig vertreten und es liegt nur eine Studie vor, die sich hierbei auf den Sysmex XT-2000iV bezieht (GRANAT et al., 2014). Auch hier weichen die Ergebnisse je nach Analysegerät voneinander ab. Der obere Referenzwert der absoluten Retikulozytenzahl gesunder Katzen reicht bei den verschiedenen Analysegeräten von  $48,6 \times 10^9$  bis  $107,1 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (MORITZ et al., 2004; WEISSERT, 2011; GRANAT et al., 2014). Häufig werden die in Laboratorien verwendeten Referenzbereiche nicht gemäß der modernen Hämatologie-Analysegeräte angepasst, sondern basieren aufgrund mangelnder Literatur auf älteren Studienerkenntnissen (BLAHA-KAPLANS, 2013).

Die Bedeutung der Klassifikation in regenerative und aregenerative Anämie als erstem diagnostischem Schritt wird durch die zahlreichen Differentialdiagnosen aufgezeigt (Abbildung 2). Entsprechend dieser graphischen Darstellung ist auch die Literaturübersicht gegliedert. Aufgrund der zahlreichen Anämieformen ist der Nutzen der maschinell ermittelten Retikulozyten und ihrer Parameter von zunehmender Bedeutung. Die Beurteilung der Retikulozyten und ihrer Parameter bezüglich einzelner Anämieformen wird im Folgenden nach gegenwärtigem Kenntnisstand und auch unter Berücksichtigung humanmedizinischer Studien aufgezeigt. Diesbezüglich konnten nur bedingt Literaturangaben gefunden werden, da speziell in aregenerativen Anämieformen oft nicht auf die Parameter der Retikulozytenanalytik eingegangen wurde.



**Abbildung 2:** Graphisch dargestellte Einteilung der Anämieformen anhand der Knochenmarkantwort. Die Gliederung entspricht der Kapitelabfolge der Literaturübersicht.

## 2.1. Regenerative Anämie

Für das Entstehen der regenerativen Anämie sind zwei Pathomechanismen verantwortlich: die Zerstörung und der Verlust von Erythrozyten. Weder bei einer Hämolyse noch bei einer Blutung wird in der Regel das Knochenmark in Mitleidenschaft gezogen. Somit ist die Regenerationsfähigkeit gegeben. Allerdings ist zu beachten, dass die Anämieform nicht immer eindeutig in regenerativ klassifiziert werden kann. So gibt es beispielsweise gemischte Anämieformen oder hämolytische Anämien, die aufgrund ihres chronisch entzündlichen Charakters eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit haben. Erfolgreich therapierte aregenerative Anämien können zu regenerativen Anämien werden (KOHN, 2001). Nimmt der Schweregrad der regenerativen Anämie zu, so erhöht sich auch die Anzahl der im peripheren Blut vorzufindenden

Reifungsstadien der Retikulozyten (JONES und GRUFFYDD-JONES, 1991). Die pseudoaregenerative Phase (Literaturübersicht 2.2.1.) muss bei allen regenerativen Anämien berücksichtigt werden, da es bei der Katze bis zu fünf Tage dauern kann, bis die Knochenmarkantwort zu einer Retikulozytose im peripheren Blut führt (HARVEY, 2008). In der Regel ist die Regeneration und damit die Zahl der Retikulozyten und der IRF bei der hämolytischen Anämie (HA) größer als bei der Blutungsanämie. Ursache hierfür ist die schnellere Verfügbarkeit von Eisen und die aus Makrophagen ausgeschütteten Mediatoren, welche die Erythropoese fördern (THOMAS, 2012).

### **2.1.1. Hämolytische Anämie**

Verschiedene Ursachen können eine HA auslösen. Eine primäre Fehlsteuerung des Immunsystems selbst kann für eine pathologische Hämolyse verantwortlich sein, aber auch gewisse äußere Einflüsse können sekundär zu einer Fehlsteuerung des Abwehrsystems führen. Die HA findet intra- oder extravasal statt (EVANS und GRUFFYDD-JONES, 1984). Bei der deutlich häufiger auftretenden extravasalen HA werden die Erythrozyten von dem mononuklearen Phagozytosesystem der Milz, Leber und des Knochenmarks ganz oder partiell phagozytiert. Das Hämoglobin wird gespalten, abgebaut und zu konjugiertem Bilirubin reduziert. Je nach Ausmaß wird die Leberkapazität der Bilirubinexkretion übertroffen und es kommt es zu einer Hyperbilirubinämie und Bilirubinurie. Die intravasale Hämolyse findet dagegen aufgrund von Fragmentierung und Veränderungen der Membranpermeabilität innerhalb der Blutgefäße statt. Charakteristisch sind ein rapider Verlauf und eine Hämoglobinämie und -urie (WILLARD und TVEDTEN, 2006). In beiden Fällen kommt es zu einem Abbau und einer verkürzten Lebensspanne der Erythrozyten. Dies induziert unter vorhandener Eisenverfügbarkeit eine gesteigerte Erythropoese. Folglich entsteht nach den initialen fünf Tagen üblicherweise eine ausgeprägte regenerative, makrozytär-hypo- oder normochrome Anämie ohne einer gleichzeitigen Hypoproteinämie (GIGER, 2000a; WILLARD und TVEDTEN, 2006; MILLER, 2009). Um Hinweise auf die Pathophysiologie der im Folgenden näher erläuterten hämolytischen Anämieformen zu gewinnen, ist es ratsam, den Blutaussstrich auf Erythrozytenfragmente, Infektionserreger, Heinzbodies, Sphärozyten und Autoagglutination zu untersuchen (THRALL et al., 2012).

### 2.1.1.1. Immunmedierte hämolytische Anämie

Die immunmedierte hämolytische Anämie (IMHA) kommt bei der Katze im Vergleich zum Hund relativ selten vor (WERNER und GORMAN, 1984). Allerdings ist die Diagnosestellung bei der Katze erschwert, da die Erythrozyten erheblich kleiner sind, keine zentrale Aufhellung besitzen und somit Sphärozyten nur bedingt im Blutaussstrich zu erkennen sind (GIGER, 2005).

Bei der Typ 2-Hypersensitivitätsreaktion werden Autoantikörper (Immunglobulin-M (IgM), Immunglobulin-G (IgG)) gegen die körpereigenen Erythrozyten gebildet und durch die anschließende Opsonisierung von dem Immunsystem beseitigt (KOHN et al., 2006; MILLER, 2009). Man unterscheidet bei der IMHA zwischen der primären und der bei der Katze häufiger auftretenden sekundären Form. Hinweisend für eine IMHA sind eine positive Autoagglutination, eine erhöhte osmotische Fragilität und der Ausschluss anderer Ursachen für eine HA. Wenn in diesem Zusammenhang der direkte Coombs-Test positiv ausfällt oder antierythrozytäre Antikörper vorliegen, ist eine IMHA sehr wahrscheinlich. Ein negativer Coombs-Test, macht die Diagnose einer IMHA äußerst unwahrscheinlich, da somit der Nachweis von Erythrozyten gebundenen Antikörpern oder Komplement negativ war (KOHN et al., 2006).

In der Regel ist die IMHA deutlich regenerativ. In einer humanmedizinischen Studie waren die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik deutlich erhöht. Die IRF betrug bei der IMHA 45,4 % (SD = +/- 18,6 %) und die absolute Retikulozytenzahl  $152,9 \times 10^9/l$  (SD = +/-  $132,3 \times 10^9/l$ ) (XU et al., 2016).

Die IMHA kann aber auch neben der initialen pseudoaregenerativen Phase, die bis zu fünf Tage dauern kann (Literaturübersicht 2.2.1.), länger aregenerativ sein. Bei dieser Form werden die Vorläuferzellen direkt im Knochenmark angegriffen, und es kommt zusätzlich zu pathologischen Umbauprozessen im Knochenmark, welche die Regenerationsfähigkeit einschränken (JONAS et al., 1987; FATHI et al., 2009). Bei 86 % der Katzen ist eine lymphozytäre Hyperplasie im Knochenmark nachgewiesen worden. Daher sollte die aregenerative IMHA von einer reinen erythroiden Hypo-/Aplasie unterschieden werden. Bei 26 Katzen mit IMHA lag in einer Studie die Absolutzahl der aggregierten Retikulozyten zwischen 0 und  $155 \times 10^9$  pro Liter. Unter den 26 Katzen befanden sich sowohl Katzen mit regenerativer als auch mit aregenerativer IMHA. Als Cut-Off-Wert für

eine aregenerative Anämie wurden  $< 40 \times 10^9$  aggregierte Retikulozyten pro Liter angegeben (FATHI et al., 2009).

#### **2.1.1.1.1. Primär immunmedierte hämolytische Anämie**

Bei der primären oder auch idiopathischen immunmedierten hämolytischen Anämie (pIMHA) kann kein auslösender Faktor für die Antikörperproduktion gegen die erythrozytäre Zellreihe gefunden werden (WERNER und GORMAN, 1984). Die Prognose bezüglich der Mortalität und tödlichen Komplikationen ist bei Katzen besser als bei Hunden (WILLARD und TVEDTEN, 2006). Die häufig bei Katzen aber nicht bei Hunden auftretende Lymphozytose und Hyperglobulinämie lässt vermuten, dass bei beiden Tierarten das Immunsystem auf unterschiedlichem Weg fungiert (KOHN et al., 2006). In einer aktuellen Studie zeigte sich, dass Lymphozytose und Hyperglobulinämie positive prognostische Faktoren waren und 32 % der Katzen mit einer pIMHA wies eine Lymphozytose auf. Katzen scheinen laut dieser Studie von 2006 häufiger als gedacht an pIMHA zu erkranken, wobei diese Erkenntnis auch auf die moderne Diagnostik zurückzuführen sein kann. Allerdings gab es Limitationen, da nicht alle Ursachen für eine sekundäre immunmedierte hämolytische Anämie (sIMHA) ausgeschlossen beziehungsweise gefunden werden konnten. Bei den untersuchten Katzen mit regenerativer pIMHA reichten die aggregierten Retikulozyten von 58.240 bis 282.000 pro Mikroliter und die punktierten von 42.546 bis 974.118 pro Mikroliter. Die Katzen mit aregenerativer Anämie hatten zwischen 0 und 28.500 aggregierte Retikulozyten pro Mikroliter sowie zwischen 0 und 131.040 punktierte Retikulozyten pro Mikroliter (KOHN et al., 2006). Die pIMHA ist in der Regel hochgradig und zeigt meist eine noch ausgeprägtere Retikulozytose als die sIMHA (JONES und GRUFFYDD-JONES, 1991). So hatte in einer aktuellen Studie die Mehrheit der Katzen mit einer pIMHA eine schwere Anämie, der mittlere HCT lag bei 11,5%. In dieser Studie konnte jedoch kein Unterschied bei der Retikulozytenzahl zwischen einer pIMHA und einer sIMHA festgestellt werden und so lag die mediane absolute Retikulozytenzahl bei 32.850 Retikulozyten pro Mikroliter. Eine aregenerative pIMHA wurde bei 25,4 % der Katzen mit  $< 50.000$  Retikulozyten pro Mikroliter festgestellt. Ein hoher Anteil der Katzen mit regenerativen pIMHA entwickelte fünf Tage nach Diagnosestellung eine robuste Regeneration (SWANN et al., 2016).

#### **2.1.1.1.2. Sekundär immunmedierte hämolytische Anämie**

Die sIMHA wird durch äußere Einflüsse ausgelöst. Üblicherweise befindet sich auf der Oberfläche der Erythrozyten ein körperfremdes Protein, welches vom Immunsystem angegriffen wird. Dieses Antigen ist Folge einer viralen oder bakteriellen Infektion, einer Medikamentenreaktion, eines chronisch entzündlichen oder eines paraneoplastischen Prozesses (OTTENJANN et al., 2006; LENARD et al., 2007). Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden vom Immunsystem beseitigt (MILLER, 2009). In einer aktuellen Studie wies 29,6 % aller Katzen mit sIMHA innerhalb fünf Tage nach Diagnosestellung keine Regeneration auf (SWANN et al., 2016).

#### *Feline Leukämievirus-Infektion*

Das weltweit vorkommende feline Leukämievirus (FeLV) gehört der Familie der Retroviridae, der Subfamilie Onkovirinae des Genus Mammalian Typ-C-Virus an. Wenn eine Mutation oder Rekombination des FeLV-Subtyps-A mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der infizierten Katze stattfindet, entstehen weitere Subtypen, von denen A, B und C bislang die wichtigsten sind. Ausschließlich FeLV-A ist infektiös und mit den Funktionen für die Replikation ausgestattet, das heißt alle natürlich infizierten Katzen tragen diesen Subtyp alleine oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen Subtypen. Der Subtyp B ist zu Minimum 50 % tumorassoziiert, wohingegen Subtyp C meist in Verbindung mit regenerativen Anämien steht (PEDERSEN, 1988). Beide sind pathogener als Subtyp A (HARTMANN, 2006).

Ungefähr 10 % aller FeLV-induzierten Anämien sind regenerativ (SHELTON und LINENBERGER, 1995). Hierunter fallen neben der sIMHA auch sekundäre Infektionen mit *Mycoplasma haemofelis* (Literaturübersicht 2.1.1.3.2.) und Blutungen, aufgrund von FeLV assoziierter Thrombozytopenien (HOPPER et al., 1989). Somit ist die Regenerationsfähigkeit abhängig von der jeweiligen zusätzlichen Komponente.

#### *Medikamente*

Medikamente können über verschiedene Mechanismen eine sIMHA auslösen. Sie können eine unspezifische Bindung des Phagozytosesystems an Erythrozyten auslösen, Antikörper gegen Erythrozyten oder EPO induzieren, sowie Protein- oder Immunkomplexe bilden, die von Antikörpern beseitigt werden (GEHRS und



FRIEDBERG, 2002). Propylthiouracil, das bei Katzen mit Hyperthyreoidismus und Nierenversagen eingesetzt wurde, kann nachweislich sIMHA auslösen. Nach Absetzen des Medikaments ist die schwere regenerative Anämie innerhalb ein bis vier Wochen reversibel (PETERSON et al., 1984; AUCOIN et al., 1985). Methimazol welches heute noch zur medikamentellen Behandlung der Hyperthyreose eingesetzt wird, kann in seltenen Fällen eine sIMHA auslösen, die ebenfalls nach Therapieabbruch reversibel ist (MOONEY, 2001).

Rekombinantes EPO und wahrscheinlich in geringerem Maße Darbepoetin können bei der Katze eine Pure Red Cell Aplasia (PRCA) verursachen (LANGSTON et al., 2003; CHALHOUB et al., 2012). Durch die Gabe von felinem anstatt humanem rekombinantem EPO kommt es unerwarteter Weise nicht zu einer statistisch signifikant geringeren Entstehung einer PRCA. Die Anti-EPO-Antikörper können sich aufgrund von Unterschieden im Allel, in der Aminosäuresequenz oder der Glykosylierung von Proteinen ausbilden. In der Regel kommt es während einer EPO-Therapie zunächst zu einem Anstieg der Retikulozyten und der IRF. Daraufhin folgt aufgrund der sIMHA eine Retikulozytopenie mit einem meist stärkeren Abfall des HCTs, als dies zu Beginn der Therapie der Fall war (RANDOLPH et al., 2004).

#### **2.1.1.2. Blutgruppen-bedingte hämolytische Anämie**

Katzen können die Blutgruppe A, B, oder AB besitzen. Zusätzlich gibt es domestizierte Kurzhaarkatzen mit einer positiven oder negativen Mik Blutgruppe (WEINSTEIN et al., 2007). Das Vorkommen der Blutgruppe ist abhängig von der Rasse und der geographischen Lage der jeweiligen Katzenpopulation (GIGER et al., 1991; GIGER et al., 1992). Katzen mit der Blutgruppe A zeigen eine schwache Immunreaktion gegen die Antigene der Erythrozytenoberfläche des Typ B, da IgG und IgM in gleichem Verhältnis vorkommen. IgG führt zu einer unvollständigen Erythrolyse, weshalb die Hämolysen extravasal vonstattengeht. Katzen mit der Blutgruppe B besitzen Anti-A-Alloantikörper (IgM), die das Komplementsystem in hohem Maße aktivieren und die Hämolysen herbeiführen (BÜCHELER und GIGER, 1993). Katzen mit der selten vorkommenden Blutgruppe AB besitzen weder Iso- noch Alloantikörper gegen die Typen A, B oder AB (GRIOT-WENK und GIGER, 1999).

Laut einer Studie zeigten Katzen mit der Blutgruppe B, denen A oder AB Blut transfundiert wurde, zu 85,9 % eine akut milde und zu 6,4 % eine akut schwerwiegende Transfusionsreaktion. Retikulozyten werden in 7,7 % hämolysiert und die Halbwertszeit der Spender-Erythrozyten beträgt ungefähr zwei Tage. Gibt man Blut mit den Blutgruppen B oder AB zu einer Katze mit der Blutgruppe A, verläuft die Transfusionsreaktion zu 4,4 % akut mild und Retikulozyten werden in 83,3 % der Fälle zerstört. Die Halbwertszeit der transfundierten Erythrozyten beträgt lediglich bis zu sechs Stunden. Diese Ergebnisse basieren auf Titer der Agglutination (GIGER und BÜCHELER, 1991; GURKAN et al., 2005).

### *Neonatale Isoerythrolyse*

Neonatale Isoerythrolyse kommt bei Katzenwelpen mit der Blutgruppe A oder AB vor, die von einer Katzenmutter mit der Blutgruppe B und somit einem hohen Anti-A-Alloantikörper-Titer innerhalb der ersten 24 Stunden Kolostrum aufnehmen. Innerhalb dieser Zeitspanne können Immunglobuline resorbiert werden, anschließend können diese jedoch aufgrund ihrer Größe nicht mehr die Darmschranke passieren. Die darin enthaltenen IgG Antikörper werden in dieser Zeitspanne resorbiert, und die nach der Geburt eintretende Hämolyse kann zu dem sogenannten nicht infektiösen „fading kitten syndrome“ und im akuten Verlauf, meist innerhalb der ersten Lebenswoche, zum Tod der Neugeborenen führen (BÜCHELER, 1999). Um eine Neonatale Isoerythrolyse zu verhindern, sollte ein Kater mit der Blutgruppe A oder AB nicht mit einer Katze der Blutgruppe B gekreuzt werden. Ist dies jedoch der Fall, sollten die Katzenwelpen die ersten 24 Stunden vom Muttertier getrennt werden und Kolostrum einer Typ A Katze erhalten (GIGER und CASAL, 1996). Nach der Kolostrumaufnahme kommt es zur intra- oder extravasalen Hämolyse, was zu einer Anämie, DIC oder Nephropathie führen kann. Der Schweregrad der Hämolyse scheint abhängig von der aufgenommenen Menge der kolostralen Antikörper zu sein (YAMADA et al., 1991; BÜCHELER, 1999).

### *Transfusionsreaktion*

Transfusionsreaktionen können zu einer akuten oder verspäteten Immunantwort und folglich zu einer intravasalen Hämolyse führen. Katzen, die keine natürlich vorkommenden Alloantikörper besitzen, entwickeln nach ein bis zwei Wochen eine Immunantwort gegen die Transfusion mit Hilfe von IgG Antikörpern (MARION und SMITH, 1983). In der Regel besitzen Katzen jedoch Allo-

antikörper gegen die ihnen fehlende Blutgruppe. Das Blutgruppenantigen Mik, welches bei den domestizierten Kurzhaarkatzen gefunden wurde, kann bei einer Transfusion eines Mik-negativen Empfängers zu einer Hämolyse führen. Somit kann eine Transfusionsreaktion auch bei Katzen entstehen, die von Seiten ihres AB-Blutgruppensystems aufeinander abgestimmt sind. Deshalb sollte die Kompatibilität von Empfänger- und Spenderblut mithilfe von Kreuzproben immer untersucht werden (WEINSTEIN et al., 2007).

In Anbetracht der möglichen Transfusionsreaktionen ist es wichtig, Parameter zu haben, die einem helfen, über die Notwendigkeit von Bluttransfusionen zu entscheiden. In einer humanmedizinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die IRF dazu dienen kann, den Nutzen einer Bluttransfusion für einen anämischen Patienten in Anbetracht der Anämieform abzuwägen. Die IRF hatte eine signifikant negative Korrelation zum Hämoglobingehalt und diese Korrelation war signifikanter als bei der absoluten Retikulozytenzahl. Dieses Ergebnis war bei akuten Anämikern stärker vertreten als bei chronischen (GELDARD et al., 2009b).

### **2.1.1.3. Blutparasiten**

#### **2.1.1.3.1. Ehrlichien**

Ehrlichien gehören der Ordnung Rickettsiales und der Familie Rickettsiaceae an und sind 0,5-1,3µm große pleomorphe Bakterien. Bei der Katze sind die equinen monozytären *E. risticii*, die equinen granulozytären *E. equi*, die caninen monozytären *E. canis* und die caninen granulozytären *E. ewingii* beschrieben. Die Infektion verläuft oft klinisch inapparent und ist im Vergleich zum Hund von geringer Bedeutung. Übertragen werden die Ehrlichien durch den Speichel infizierter verschiedener Zeckengattungen. In Einzelfällen treten klinische Symptome auf und die Katzen zeigen in der Regel eine milde normozytär-normochrome, aregenerative Anämie. Kommt es zu einer chronisch manifesten Verlaufsform, kann eine aplastische Anämie ausgelöst werden (NEER et al., 2002; KEARNS und EWING, 2006).

#### **2.1.1.3.2. Hämotrophe Mykoplasmen**

Hämotrophe Mykoplasmen (auch Hämoplasmen) gehören zu der Familie der Mycoplasmataceae und sind gramnegativ, zellwandlos, säurefest und parasitieren marginal auf Erythrozytenmembranen. *Mycoplasma haemofelis* und *Candidatus Mycoplasma turicensis* sind im Vergleich zu *Mycoplasma*

*haemominutum* pathogener und führen somit häufiger zu einer Anämie, die einen sehr milden bis hin zu einem sehr schwerwiegenden Verlauf haben kann (TASKER et al., 2003). *Mycoplasma haemomintum* führen bei Hunden und Katzen meistens zu asymptomatischen Infektionen (FOLEY und PEDERSEN, 2001). Diese haemotrophen Bakterien haben bei Immunsuppression (z. B. FeLV, FIV (HOPPER et al., 1989)) eine hochgradige HA mit persistierenden Infektionen verschiedener innerer Organe zur Folge (SHAW et al., 2004; JUST und PFISTER, 2006). Für die Entstehung der Anämie ist in erster Linie die sIMHA verantwortlich. Die extravasale Hämolyse steht gegenüber der intravasalen Hämolyse im Vordergrund (ZULTY und KOCIBA, 1990; ALLEMAN et al., 1999). Zudem geht man davon aus, dass Hämoplasmen die Lipide aus der Erythrozytenmembran entweder durch lipolytische Enzyme oder durch ihren eigenen Stoffwechsel reduzieren und damit zu einer erhöhten osmotische Fragilität der Erythrozyten führen (MAEDE, 1980). Somit ist der Ikterus kein klassisches Bild einer infizierten Katze, denn extravasal werden die beschädigten Erythrozyten effektiv beseitigt, oder es kommt zu deren Sequestration in Milzgefäßen (MAEDE, 1978). In gefärbten Blutaussstrichen können Hämoplasmen in Form von kleinen (0,1-0,9µm) der Erythrozytenmembran aufliegenden Körperchen dargestellt werden (BRADDOCK et al., 2004). Die Retikulozytenparameter müssen nicht zwangsläufig erhöht sein. In einer Studie stiegen die Retikulozyten 21 Tage nach der Infektion mit Hämoplasmen  $> 50 \times 10^9$  pro Liter an und erreichten zwischen dem 25. und 49. Tag ihren Höhepunkt. Zudem erholten sich auch Katzen ohne Anzeichen einer Regeneration von der Anämie. Man ging davon aus, dass sequestrierte Erythrozyten in der Milz von den Hämoplasmen befreit und in die Blutbahn entlassen wurden. Zudem wiesen Katzen unter Therapie mit Marbofloxacin weniger Retikulozyten auf, da sie mit weniger Regenerationsfähigkeit gegen die Anämie ankämpfen mussten (TASKER et al., 2006).

#### **2.1.1.3.3. Babesiose**

Zahlreiche Säugetiere weltweit, unter anderen der Mensch, werden von Babesien infiziert. Diese Blutparasiten gehören zu der Gattung *Babesia* und der Klasse *Piroplasma*. Bei der Katze ist das Vorkommen folgender großer Babesien Arten beschrieben worden: *B. herpailuri* bei südamerikanischen Kleinkatzen, *B. pantherae* bei dem afrikanischen Leopard, *B. canis* in Europa und *B. canis ssp. persentii* in Israel jeweils bei klinisch kranken Hauskatzen. *B. vogeli* wurde in

Thailand und die noch wenig erforschte *B. honkongensis sp. nov.* bei Hauskatzen in Hongkong nachgewiesen. Zu den kleinen Babesien gehören: *B. felis* vorwiegend in Südafrika, aber auch Südasien und Europa, *B. cati* in Indien, *B. leo* bei afrikanischen Wildkatzen, *B. lengau* bei Hauskatzen und Geparden und *B. microti-like spp.* in Portugal (BANETH et al., 2004; PENZHORN et al., 2004; SOLANO-GALLEGO und BANETH, 2011; HARTMANN et al., 2013). In gefärbten Blutaussstrichen sieht man bei den großen Babesien (2,5-5,0µm), wie z. B. *B. canis*, typischerweise je zwei birnenförmige Merozoiten im Zytoplasma der Erythrozyten. Die kleinen Babesien (1,0-2,5µm), zu denen auch *B. felis* gehört, weisen tendenziell eine rundliche Gestalt auf. Im Vergleich zum Hund hat Babesiose bei der Katze nur eine geringe Bedeutung und die Symptome sind meist mild und unspezifisch, da die Endotoxine besser toleriert werden können. *B. felis* ist jedoch im Vergleich zu den anderen Arten pathogener und führt zu einer HA mit chronischem Verlauf, sodass die Anämie recht gut toleriert werden kann, solange kein zusätzlicher Stress hinzukommt. Häufig sind jedoch Koinfektionen vorhanden (SCHOEMAN et al., 2001; BANETH et al., 2004). Durch den Biss einer Zecke gelangen Babesienstadien (Sporozoiten) über den Speichel in den Wirt und entwickeln sich über Trophozoiten zu Merozoiten. Die Merozoiten werden freigesetzt und gelangen durch Endozytose in neue Erythrozyten (SCHOEMAN et al., 2001). Gewisse Babesien bevorzugen es Retikulozyten oder junge Erythrozyten zu befallen. Retikulozyten und deren Parameter sind gewöhnlich erhöht und es liegt eine makrozytär-hypochrome, regenerative Anämie und Hyperbilirubinämie vor (SCHOEMAN et al., 2001).

#### **2.1.1.3.4. Cytauxzoonose**

*Cytauxzoon felis* sind Protozoen der Ordnung Piroplasmidae und der Familie Theileriidae, die bei Haus- und Wildkatzen ausschließlich in den Südstaaten der USA vorkommen. Als primäres Erregerreservoir neben anderen Feliden dienen dem Blutparasit persistierend infizierte asymptomatische Rotluchse (*Lynx rufus*) (NIETFELD und POLLOCK, 2002). In den Feliden kommt der Erreger nach einer Inkubationszeit von 5 bis 20 Tagen als erythrozytäres und extraerythrozytäres Stadium im Gewebe vor. Letzteres ist hochinfektiös und kann entweder über die Amerikanische Hundezecke (*Dermatocentor variabilis*) oder durch Gewebe von Tier zu Tier übertragen werden (BLOUIN et al., 1984). Hat die Übertragung des extraerythrozytären Stadiums stattgefunden, findet eine

fulminante Schizogonie statt und die entstandenen Merozoiten infizieren und zerstören die Erythrozyten (KOCAN et al., 1992). Die siegelring-, sicherheitsnadel- oder punktförmigen kleinen (1-2µm) Merozoiten können anhand eines gefärbten Blutaussstriches normalerweise ein bis drei Tage vor dem Tod der Katze diagnostiziert werden. Dieser Zeitpunkt äußert sich auch durch eine Fieberphase als Zeichen der Parasitämie (KIER et al., 1987). Zwischen 0,5 und 4 % der Erythrozyten sind infiziert, wobei es innerhalb von 24 Stunden zu einem enormen Anstieg kommen kann. Neben chronisch progressivem und letalem Verlauf können Katzen mit einem schwachen Immunsystem die akute Erkrankung überleben (FRONTERA-ACEVEDO et al., 2013). Die akute Phase verläuft in der Regel aregenerativ und es kommt zur normozytär-normochromen Anämie. Die wenigen Katzen, die die akute Phase überleben, entwickeln eine Retikulozytose (WALKER und COWELL, 1995).

#### **2.1.1.4. Metabolisch bedingte hämolytische Anämie**

Schwere Hypophosphatämie kann bei Katzen zu einer extravasalen Hämolyse und Entstehung von HB führen (ADAMS et al., 1993). Phosphor und Magnesium sind für die Bildung von Adenosintriphosphat und 2,3-Diphosphoglycerat zuständig, welche für zahlreiche hämatologische und neuromuskuläre Prozesse im Körper von Bedeutung sind. Sind diese zwei Metaboliten sowie Glutathion vermindert, führt dies zu einer erhöhten Fragilität, Anfälligkeit für oxidative Schädigung und Hämolyse der Erythrozyten (MALLET, 2002). Zu einem Mangel an Glutathion kommt es durch die Beeinträchtigung der Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat und dem fehlenden Eintritt von Glukose in den Pentose-Monophosphat-Zyklus. Dies kann eine vermehrte Bildung von HB zur Folge haben (CHRISTOPHER, 1989; CHRISTOPHER et al., 1990; ADAMS et al., 1993). Sind Katzen mit Diabetes mellitus (D.m.) mit und ohne Ketoazidose erkrankt, kann es zu einer schweren Hypophosphatämie kommen, indem durch die Insulintherapie vermehrt Phosphor in die Zellen transportiert wird (WILLARD et al., 1987).

Bezüglich der übermäßigen enteralen oder parenteralen Zwangsernährung, dem sogenannten Refeeding Syndrom, ist in der Tiermedizin wenig Literatur vorhanden (JUSTIN und HOHENHAUS, 1995). Erhält ein Organismus nach einer Phase der Mangelversorgung abrupt ausreichend Energieträger, schüttet der Körper vermehrt Insulin aus, um Glukose in die Zellen zu transportieren.

Hierdurch kommt es zu einer Hypophosphatämie-induzierten Hämolyse, welche hochgradig ausfallen kann. Es kommt in der Regel zu einem Anstieg der Retikulozytenparameter. Der Hämatokrit normalisiert sich innerhalb von drei Wochen (ADAMS et al., 1993).

#### **2.1.1.5. Hereditäre Erythrozytendefekte**

Hereditäre Erythrozytendefekte können sich auf das Häm, das Hämoglobin, die Erythrozytenmembran oder die erythrozytären Enzyme auswirken und so zu einer HA führen. Sie kommen selten vor und werden bis auf eine Ausnahmeform der Porphyrie alle autosomal rezessiv vererbt (GIGER, 2000b).

Über die Parameter der Retikulozytenanalytik bei hereditären Erythrozytendefekten ist in der Literatur wenig beschrieben. In einer humanmedizinischen Studie betrug die IRF bei der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Defizienz 42,2 % (SD = +/- 13,4 %) und war damit deutlich erhöht. Die absolute Retikulozytenzahl war mit einem Wert von  $122,7 \times 10^9/l$  leicht erhöht (SD = +/-  $61,9 \times 10^9/l$ ) (XU et al., 2016).

##### **2.1.1.5.1. Cytochrom-b5-Reduktase-Defizienz**

Cytochrom-b5-Reduktase-Defizienz wurde bei Katzen, Hunden und Rhesusaffen beschrieben. Diese Reduktase katalysiert die Reduktion des Häms mit dem dreiwertigen Eisen-Ion in den zweiwertigen Zustand. Eine Defizienz führt folglich zu einer Methämoglobinämie. Typischerweise tritt neben der Zyanose eine Erythrozytose und seltener stattdessen eine leichte HA auf (HARVEY, 2006). Auch wenn nur 40 % der Cytochrom-b5-Reduktase aktiv ist, müssen klinisch noch keine Symptome auftreten (GIGER et al., 1999).

##### **2.1.1.5.2. Pyruvatkinase-Defizienz**

Pyruvatkinase-Defizienz (PK-Defizienz) wurde bei Somali-, Europäisch Kurzhaar- und Abessinierkatzen beschrieben und wird autosomal rezessiv vererbt (GIGER et al., 1997). In einer neueren Studie wurde die PK-Defizienz in weiteren Rassekatzen nachgewiesen und sollte bei folgenden Rassen und deren Kreuzungen getestet werden: Bengale, Ägyptische Mau, LaPerm, Maine-Coon, Norwegische Waldkatze, Savannah, Sibirische und Singapura Katze (GRAHN et al., 2012). Die PK katalysiert den letzten Schritt der ATP-Erzeugung bei der anaeroben Glykolyse. Kommt es zu einem fehlerhaften Splicing des R-PK-Gens und folglich zu einer 13-Basenpaar-Deletion des Exons am 3'-Ende der cDNA,

steht hauptsächlich den Retikulozyten und jungen Erythrozyten zu wenig ATP zur Verfügung. Die Retikulozyten- und Erythrozytenmembranen sind defekt und anfällig für eine Hämolyse. Klinisch können die Katzen unter einer chronischen Anämie, einer intermittierenden makrozytären HA mit einer geringgradigen Splenomegalie oder einer hämolytischen Krise leiden (GIGER et al., 1997). Die meisten Katzen haben eine deutlich verkürzte Überlebenszeit. Bei einer hämolytischen Krise ist eine Bluttransfusion indiziert und bei starker Splenomegalie und schwerer Anämie führt die Splenektomie, welche eine dauerhafte Retikulozytose zur Folge hat, zu einer Besserung (HARVEY, 2006; KOHN und FUMI, 2008). Der HCT liegt zwischen 5 % und 35 % und die absolute Retikulozytenzahl zwischen 45.000–290.000 pro Mikroliter (KOHN et al., 2005). In einer weiteren Studie hatten 16 von 18 Katzen erhöhte aggregierte Retikulozyten zwischen 43.000 und 936.000 pro Mikroliter. Nur acht Katzen zeigten eine leichte Anämie mit einem HCT von 22 % bis 29 %, die anderen Katzen hatten einen HCT im Referenzbereich. In Relation zu der Schwere der Anämie verhält sich die Regeneration anhand der Retikulozytenzahlen in Maßen, denn die Milz eliminiert primär die immaturen Zellen (MENTZER et al., 1989).

#### **2.1.1.5.3. Membrandefekte**

Das Osmotische Fragilität Syndrom bei Somali- und Abessinierkatzen ist sehr wahrscheinlich auf einen hereditären Membrandefekt zurückzuführen. Labor-diagnostisch ist eine chronisch intermittierende HA meist mit einem HCT zwischen 15–25 %, einer stark erhöhten Fragilität und einer persistierenden Makrozytose beschrieben. Die Makrozytose kann auch auftreten, wenn kein erniedrigter HCT, keine erhöhten Retikulozyten und keine Agglutination vorhanden sind. Ein sehr hohes MCV ist vor allem auf eine Erythrozytenagglutination zurückzuführen, aber auch wenige Stomatozyten mit erhöhtem intrazellulärem Flüssigkeitsgehalt konnten als Ursache nachgewiesen werden. Eine hochgradige Splenomegalie, beruhend auf einer Kongestion der roten Milzpulpa, extramedullärer Hämatopoese, Hämosiderose und einer lymphatischen Hyperplasie, ist ein typisches klinisches Bild (KOHN et al., 2000).

In einer humanmedizinischen Studie ließ eine absolute Retikulozytenzahl von  $> 80 \times 10^9$  pro Liter zusammen mit einer Retikulozytenzahl/IRF Ratio  $> 7,7$  auf eine milde hereditäre Sphärozytose und damit pathophysiologisch auf Membran- und Zytoskelettdefekte schließen (MULLIER et al., 2011).



#### **2.1.1.5.4. Porphyrie**

Porphyrien sind Enzymdefekte in der Hämsynthese, die zu einer Akkumulation von Häm-Vorläufern (Uroporphyrin I, Coproporphyrin I, Protoporphyrin IX) in Zellen und Körperflüssigkeiten führen.

Bei Europäisch Kurzhaar Katzen ist die Porphyrie durch Verfärbungen der Zähne und des Urins, jedoch durch keine Anämie und Photosensitivität gekennzeichnet. Diese Verfärbungen sind auf die fluoreszierenden Häm-Vorläufer zurückzuführen (KANEKO, 2000). Siamkatzen hingegen können unter einer schweren makrozytär-hypochromen Anämie, einer Hepato- und Splenomegalie, Niereninsuffizienz und erhöhten Photosensitivität leiden. Im Blutausstrich sind Howell-Jollybodies, Normoblasten, Poikilozyten und Targetzellen auffindbar. Es liegt eine Anisozytose vor (GIDDENS JR et al., 1975) und eine erhöhte Anzahl an Retikulozyten (WATSON et al., 1964).

#### **2.1.1.6. Oxidativ bedingte hämolytische Anämien**

Das Hämoglobin von Katzen weist acht bis zehn freie reaktive Sulfhydrylgruppen auf. Diese speziesspezifische hohe Anzahl der anfälligen Sulfhydrylgruppen prädisponiert das Hämoglobin zu oxidativer Schädigung durch freie Radikale (JAIN, 1973). Des Weiteren entfernt die Milz der Katze Erythrozyten mit HB weniger effektiv, da sie ein weitmaschigeres Netzwerk besitzt (SEKI und ABE, 1985). Somit können je nach Literaturangabe bis zu 5 % oder 10 % der Erythrozyten bei gesunden Katzen HB aufweisen (BLUE und WEISS, 1981; WEISS, 1984; CHRISTOPHER, 2000).

Erythrozyten enthalten physiologischerweise eine kleine Menge an Methämoglobin, welches regelmäßig von erythrozytären Antioxidantien zu Oxyhämoglobin reduziert wird. Nimmt die oxidative Schädigung überhand, können die Erythrozyten mittels Reduktion nicht ausreichend gegensteuern, und es wird zu viel Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert. Dadurch kommt es zu einer Polymerisation, ein HB fällt aus und aggregiert an der inneren Erythrozytenmembran, was die Verformbarkeit der Erythrozyten einschränkt. Die Fragilität der Erythrozyten und Beseitigung durch die Milz nimmt zu. Eine Akkumulation von zahlreichen HB kann sowohl zu einer intravasalen als auch zu einer extravasalen Hämolyse führen (BLOOM und BRANDT, 2001).

Phenylhydrazin, ein natürlicher Stoff in einigen Pflanzen wie z. B. Leguminosen,

führt zu einer oxidativen Denaturierung des Hämoglobins. Je nach Ausmaß der hämolytischen Anämie kommt es zu einem entsprechenden Anstieg der Retikulozyten und ihrer Parameter im Blut (GHAFARI, 2008).

#### **2.1.1.6.1. Diabetes mellitus mit/ohne Ketoazidose**

Die oxidative Schädigung kann bei der Katze mit D.m. verschiedene Ursachen haben: Die Autooxidation von Glucose und konsekutiv die Bildung von Radikalen, die Oxidation von Lipoproteinen und die Fehlfunktion von Antioxidantien und Entzündungsmediatoren. Es kommt zu einer erhöhten Anzahl von HB, die bei der Diabetischen Ketoazidose besonders prominent erscheinen (CHRISTOPHER et al., 1995). Im Rahmen einer Hyperthyreose und bei Neoplasien werden durch ähnliche Prozesse, wie z. B. einer vermehrten Glukoneogenese oder einem Abbau von Proteinen, oxidative Schädigungen vermutet (CHRISTOPHER et al., 1989; VENDITTI und DI MEO, 2006).

In Abwesenheit einer Niereninsuffizienz steigen bei D.m. gewöhnlich die Parameter der Retikulozytenanalytik an. Eine inadäquate Retikulozytose kann jedoch schon vor ersten Anzeichen einer Niereninsuffizienz auftreten. Aufgrund der Chronizität der Erkrankung kann eine relative Resistenz gegenüber EPO entstehen (CRAIG et al., 2005).

#### **2.1.1.6.2. Hepatolipidose**

Die Hepatolipidose entsteht bei anorektischen, vorwiegend weiblichen Katzen als Folge einer Mobilisierung der Fettreserven und Umstellung des Stoffwechsels. Die Fetteinlagerung kann sich in wenigen Tagen bis hin zu zwei Wochen entwickeln (ADAMS et al., 1993). Typische Blutbildveränderungen können eine Poikilozytose und HB sein. Die HB können innerhalb von Stunden auftreten und oft sind primäre, die Hepatolipidose begünstigende Erkrankungen (D.m., Hyperthyreoidismus, Pankreatitis und andere Lebererkrankungen) zusätzlich für die HB-Entstehung verantwortlich (CHRISTOPHER, 1989). Aufgrund des Energie- und Proteinmangels kommt es zu einem verminderten Metabolismus von S-Adenosylmethionin, welches für die hepatozelluläre Produktion von Glutathion zuständig ist. Somit kommt es systemisch zu einer oxidativen Schädigung. Centers Studie zufolge hatten 31 % aller Katzen eine Anämie, jedoch nur eine Katze hatte eine starke Retikulozytose (CENTER et al., 1993). Initial lag eine milde aregenerative Anämie bei 22 % aller erkrankten Katzen vor. Aufgrund von

Hämolyse und Blutverlust bei dem Legen einer Ernährungssonde oder durch Phlebotomie kann der Hämatokrit weiter abfallen und so benötigten ungefähr 25 % der Katzen infolge ihrer schweren akuten Anämie Spenderblut oder Erythrozytenkonzentrat (CENTER, 2005).

#### **2.1.1.6.3. Arzneimittel, Chemikalien und Futtermittelzusatzstoffe**

Oxidative Schädigungen sind durch Acetaminophen, Benzocainen, Methylenblau, Methionin, Lidocain, wiederholte Propofolgabe, Zink, Vitamin K und Hydroxyurea bekannt. Da die Konjugation von Sulfaten und der Abbau von Glutathion bei der Katze eingeschränkt ist und die Bindung von Glucuronsäure ausbleibt, werden die genannten Stoffe in der Leber unzureichend metabolisiert und können freie Radikale induzieren (SCHECHTER et al., 1973; WATSON et al., 1994; ANDRESS et al., 1995; ARONSON und DROBATZ, 1996; FELDMAN und ETTINGER, 2000; LASCELLES et al., 2007; KOVALKOVIČOVÁ et al., 2009; O'BRIEN et al., 2010). Allerdings führt die wiederholte kurzzeitige Propofolgabe zu keinen klinisch relevanten Blutbildveränderungen (MATTHEWS et al., 2004; BLEY et al., 2007). Des Weiteren scheint auch Methylenblau keine HB induzierte HA auszulösen (RUMBEIHA und OEHME, 1992).

Gewisse Futtermittel und deren Zusatzstoffe führen zur HB-Entstehung. So führt Allicin in Knoblauch/-extrakt und N-Propyldisulfid in Zwiebeln sowie Propylenglykol und bestimmte Fischdiäten zu einer HB-Anämie (KOBAYASHI, 1981; CHRISTOPHER et al., 1989; CHRISTOPHER, 2000; AMAGASE et al., 2001). Das Ausmaß der Anämie und der damit zusammenhängende Anstieg der Retikulozyten wurden in einer Studie über Katzen beschrieben. So waren die Anämie, die Entstehung von HBs und die Retikulozytose nach Verabreichung von 3%-iger pulverisierter Zwiebel stärker ausgeprägt als bei 1%-iger. Die Retikulozytose erreichte ihren Höhepunkt nach 3,5 Wochen, wobei vorwiegend punktierte Retikulozyten vorlagen (HILL et al., 2001).

#### **2.1.1.7. Osmotisch bedingte hämolytische Anämie**

Osmotisch wirksame Teilchen können Zellen zum Platzen bringen. Bei der Gabe eines phosphathaltigen Makroklists ist die Konzentration zu hoch, was für Katzen tödlich enden kann (TOMSA et al., 2001). Osmotisch wirksame Teilchen ziehen Wasser mit sich in das Innere der Erythrozyten. Der kolloidosmotische Druck ist

größer als der hydrostatische und somit nehmen die Erythrozyten mehr Wasser auf, als ihre Kapazität es zulässt. Durch den entstandenen Überdruck im Zellinneren zerreißt die Erythrozytenmembran (THEWS und VAUPEL, 1990).

#### **2.1.1.8. Mechanisch bedingte hämolytische Anämie**

Eine mechanische Schädigung der Erythrozyten durch Hindernisse in der Blutbahn führt typischerweise zu kleinen stark verformten Erythrozyten, den sogenannten Schistozyten. Diese treten jedoch bei der Katze weniger häufig auf als beim Hund. Möglicherweise kann dies an den kleineren und somit weniger anfälligeren Erythrozyten der Katze liegen (THOLEN et al., 2009). Neben den folgenden Gründen einer mechanisch bedingten hämolytischen Anämie können Herzklappenerkrankungen, Thromben und Implantate im Herz-Kreislauf-System die Erythrozyten mechanisch schädigen (GIGER, 2005).

##### **2.1.1.8.1. Disseminierte intravasale Gerinnung**

Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), auch Verbrauchskoagulabilität, gehört zu den Vaskulopathien. Durch eine überschießende Blutgerinnung im Blutgefäßsystem kommt es zum Verbrauch der Gerinnungsfaktoren und folglich zur hämorrhagischen Diathese. Das Endothel von Kapillaren wird beschädigt, woraufhin sich Fibrinfäden bilden, welche zu einer Fragmentierung der Erythrozyten führt und folglich zu der Anämie. Die DIC ist häufig (76 %) assoziiert mit Neoplasien, Sepsis, Pankreatitiden, Traumata, Hitzeschlag, Hepatopathien, Magendrehungen und immunmedierten Erkrankungen (ESTRIN et al., 2006). Die Regenerationsfähigkeit hängt somit stark von der zugrundeliegenden Erkrankung ab.

##### **2.1.1.8.2. Hämangiosarkom**

Im Kapillargebiet von Tumoren kann es ebenfalls zu einer Schädigung der Erythrozyten kommen. Nahezu jeder Tumor kann zu einer DIC führen, wobei das Hämangiosarkom meist impliziert ist. Das Hämangiosarkom ist anders als beim Hund ein relativ seltener Tumor und kommt vorwiegend als kutane Form vor (SCHULTHEISS, 2004). Viszerale Hämangiosarkome führen in 82 % der erkrankten Katzen zu einer Anämie (CULP et al., 2008). Die Regenerationsfähigkeit ist gegeben, wenn die Schädigung im Endstromgebiet oder die Tumorbildung Auslöser für die Anämie sind. Allerdings kann durch retikuloendotheliale Phagozytose und Knochenmarkdepression auch eine aregenerative Anämie

überwiegen. Bei Hunden sieht man vorrangig bei Hämangiosarkomen der Leber eine ausgeprägte hypochrome regenerative Anämie, welche weniger ausgeprägt bei pulmonalen und skelettalen Hämangiosarkomen ist. Bei dem kardialen Hämangiosarkom tritt hingegen lediglich eine Fragmentation der Erythrozyten in Erscheinung (REBAR et al., 1980).

#### **2.1.1.8.3. Caval Syndrom**

Das Caval Syndrom ist eine bei der Katze seltene Komplikation einer Infektion mit Herzwürmern (*Dirofilaria immitis*), bei der die Adulten den rechten ventrikulären Einflusstrakt obstruieren. *D. immitis* kommt vor allem in Norditalien vor, wurde aber auch bereits in Deutschland in Mücken nachgewiesen (KRONEFELD et al., 2014). Merkmale des Syndroms sind ein Herzgeräusch der Trikuspidalklappe und intravaskuläre Hämolyse durch eine Fragmentierung der Erythrozyten. Folglich kommt es zu einer Hämoglobinämie und -urie und gegebenenfalls auch zu einer DIC und kongestivem Herzversagen (COHN, 1995; STRICKLAND, 1998).

#### **2.1.1.8.4. Mikroangiopathische, hämolytische Anämie**

Die Mikroangiopathie ist eine vaskuläre Erkrankung, die oft mit oben genannten mechanisch bedingten Anämieformen, mit einer urämischen Anämie und Vaskulitis assoziiert ist. Da der Durchmesser der erkrankten Gefäße für ein reibungsfreies Durchströmen der Erythrozyten zu gering ist, kommt es zu einer Schädigung und Verformung der Erythrozyten, wodurch Schistozyten und Keratozyten auftreten können. Die Milz dient als Kontrollsystem für die Beseitigung geschädigter Erythrozyten. Der Verlauf ist meist subklinisch. Es kommt zu einer milden bis mäßigen Anämie mit keiner oder einer mäßigen Retikulozytose und oft auch einer Thrombozytopenie (GIGER, 2005).

#### **2.1.1.9. Anämie durch Hämolsine**

##### **2.1.1.9.1. Bakterielle Hämolsine**

Gewisse Bakterien produzieren als Virulenzfaktoren Hämolsine, welche Erythrozyten angreifen und hämolysieren können. Staphylokokken bilden vier verschiedene Hämolsine, die je nach Erythrozytenspezies unterschiedlich wirken. Auch andere bedeutende Bakterien wie Streptokokken, Clostridien, Leptospiren, gewisse Stämme von Enterobakterien, Escherichia und Aeromonaden produzieren Hämolsine (CASMAN, 1960; YURI et al., 1998; ROLLE und MAYR, 2007).

### **2.1.1.9.2. Tierische Hämolsine**

Durch Insektenstiche und Insektenbisse können Hämolsine übertragen werden, die zu einer Hämolyse der Erythrozyten führen. So übertragen gewisse Hymenoptera (Hautflügler), wie z. B. die *Apis mellifera* (westliche Honigbiene), und *Solenopsis* sp. (Feuerameisen) hämolysierende Toxine (FITZGERALD und FLOOD, 2006). Mellitin, ein Hauptbestandteil des Bienengiftes, unterstützt das IgG bei der Bildung eines Immunkomplexes mit Erythrozyten (CLAGUE und CHERRY, 1989). Schlangengifte, auch das Gift der in Deutschland häufig auftretenden *Vipera berus* (Kreuzotter), können Hämolsine enthalten (GITHENS und BUTZ, 1929).

### **2.1.1.9.3. Chemische Hämolsine**

Chemische Substanzen wie Zink, Blei, Kupfer und Quecksilber führen zu einer Hämolyse von Erythrozyten. Zink ist in zahlreichen Hautcremes, Münzen und metallischen Gegenständen vorhanden. Der genaue Mechanismus der Schädigung durch Zink ist noch nicht bekannt, man vermutet die Hemmung des Hexose-Phosphat-Weges und damit eine oxidative Schädigung, die durch HB und Ekzentrozyten im gefärbten Blutaussstrich erkennbar sein kann (GURNEE und DROBATZ, 2007). Zink und Acridin-Orange führen aber auch zu einer Clusterbildung der Bande-3 der Erythrozyten, was dem IgG durch eine geringere Distanz zur Immunkomplexbildung verhilft (CLAGUE und CHERRY, 1989).

### **2.1.1.10. Hypersplenismus**

Bei Menschen tritt definitionsgemäß bei einem Hypersplenismus eine periphere Pan-/Zytopenie, die sich bei Splenektomie bessert, sowie eine reaktive Hyperplasie des Knochenmarks und eine Splenomegalie auf (SPANGLER und KASS, 1999). Bei dem Hypersplenismus ist Splenomegalie häufig mit einer portalen Hypertension assoziiert. Im Rahmen einer Leberzirrhose können die Milzgefäße meist weiter sein als bei einer neoplastisch (z. B. Lymphom) oder hämatologisch veränderten Milz, sodass mehr Blutzellen sequestrieren können. Es kann zu einer Sequestrierung einer oder mehrerer Blutzellreihen kommen (PETERS, 1983). Demzufolge ist das Knochenmark normo- bis hyperzellulär. Primärer Hypersplenismus kommt sehr selten bei Tieren vor und ist eine Ausschlussdiagnose, falls keine zugrundeliegende Ursache gefunden werden kann (KUEHN und GAUNT, 1986). Eine Splenektomie ist die „Therapie der Wahl“, welche bei Hunden und Katzen besser toleriert wird als beim Menschen, bei dem

in Folge einer Splenektomie oft eine Sepsis auftritt. In dem Blutaussstrich können Fragmentozyten und tränenförmige Erythrozyten sowie Dakryozyten als Hinweis auf eine mechanische Komponente beim Passieren der Milz-Sinusoide auftreten (JAIN, 1993).

### **2.1.2. Blutungsanämie**

Neben der Hämolyse ist die Blutung eine wichtige Differentialdiagnose der regenerativen Anämie. Man unterscheidet die lokale und die systemische Blutungsneigung. Ursachen für die lokale Blutungsneigung sind örtliche begrenzte Gefäßrupturen aufgrund von z. B. Entzündungen, Ulzera, Neoplasien, Parasiten oder Traumata (HATHAWAY, 1976). Ursachen für die systemische Blutungsneigung sind hereditäre oder erworbene Hämostasesstörungen. Die primäre Hämostasesstörung wird in Vaskulopathie, Thrombozytopathie und Thrombozytopenie untergliedert (PETERSON et al., 1995). Die sekundäre Hämostasesstörung entsteht aufgrund mangelnder Gerinnungsfaktoren, beispielsweise durch die Intoxikation mit antikoagulatorischen Rodentiziden, die Vitamin K inaktivieren (KOHN et al., 2003). Eine weitere Einteilung der Blutungsanämie findet anhand ihres zeitlichen Auftretens statt und kann somit akut oder chronisch sein.

#### **2.1.2.1. Akute Blutungsanämie**

Das Blutvolumen einer Katze beträgt zwischen 40 und 67 ml/kg (SPINK et al., 1966; BREZNOK und STRACK, 1982) und befindet sich durchschnittlich zu 10 % in Arterien, zu 20 % in Kapillaren und zu 70 % in Venen. Ein akuter Blutverlust bis zu 20 % wird bei den meisten Tieren toleriert, ohne dass eine Bluttransfusion nötig ist, bei 30 bis 40 % kommt es zu einem hypovolämischen Schock und bei über 50 % führt es ohne Intensivtherapie zum Tode (NELSON, 1976; MCGUILL und ROWAN, 1989). Durch den intravasalen Volumenmangel lassen sich die ersten Symptome aufgrund einer Hypovolämie erkennen. Die Katzen zeigen zunächst einen schnellen, schwachen Puls, Hypothermie und eine verlängerte kapilläre Füllungszeit. Erst nach einigen Stunden kommen der Anämie entsprechend blasse Schleimhäute und Apathie hinzu (MCGUILL und ROWAN, 1989). Akute Blutungen treten häufig nach Traumata und Operationen auf, seltener kommen sie bei anderen akut auftretenden Erkrankungen und deren Folgen vor. Erst innerhalb von einigen Stunden wird der Blutverlust labordiagnostisch ersichtlich, da die Hypovolämie zu einer Verlagerung der

extrazellulären Flüssigkeit in das Gefäßsystem führt. Dieser Flüssigkeitsausgleich mit dem Ziel, eine Normovolämie zu erreichen, kann 24 Stunden oder länger dauern und spiegelt erst dann den wahren Wert des HCT- und Proteinabfalls wieder. Entscheidend ist, in welchem Körperkompartiment die Blutung auftritt. Blutungen durch äußere Öffnungen, wie Hämatemesis, Hämatchezie, Meläna und Hämaturie sowie traumatisch bedingte Blutungen sind durch einen Abfall der Plasmaproteine charakterisiert. Da das Totalprotein schneller als die Erythrozyten ersetzt werden kann, ist ein erniedrigtes oder ein im unteren Referenzbereich befindliches Totalprotein möglicherweise ein erster Hinweis für einen akuten Blutverlust nach außen (TVEDTEN, 2010). Innere Blutungen hingegen haben keine Hypoproteinämie zur Folge, da die Proteine wieder rückresorbiert werden. Bei einem Hämothorax oder Hämoperitoneum können auch ungefähr 80 % der Erythrozyten in einer Zeitspanne von ein bis zwei Wochen durch Resorption wieder in die Blutbahn gelangen (GIGER, 2005). Erst am zweiten Tag nach einer akuten Blutung erscheinen bei der Katze aggregierte Retikulozyten im Blut, die ihren Peak zwischen dem vierten und sechsten Tag erreichen. Somit ist die Katze drei bis fünf Tage pseudoaregenerativ (HARVEY, 2008). Während dieser Phase liegt eine normozytär- normochrome Anämie vor. Je nach Maß der Regeneration geht diese in eine makrozytäre und eventuell auch hypochrome Anämie über (AIRD, 2000). Je nach Schweregrad der Anämie ist die Reifungszeit der Retikulozyten in dem Knochenmark verkürzt, die IRF steigt an, da die MFR und die HFR zunehmend in das periphere Blut ausgeschwemmt werden. Beim Menschen ist der Anstieg der IRF bei einer akuten hochgradigen Blutungsanämie nach bis zu acht Stunden zu sehen, wohingegen ein signifikanter Retikulozytenanstieg erst nach bis zu 48 Stunden vorliegt. Liegt eine interne Blutung vor, so ist die Regenerationsfähigkeit schneller als bei äquivalenten externen Blutungen, da das Eisen und die Proteine nicht verloren gehen (THOMAS, 2012).

#### **2.1.2.2. Chronische Blutungsanämie (Eisenmangelanämie)**

Eine Eisenmangelanämie entsteht am häufigsten durch eine chronische Blutungsanämie bei der Katze. Sie tritt erst dann auf, wenn der kontinuierliche Verlust von Eisen die Eisenspeicher im Gewebe aufgebraucht hat und das Eisen nicht wieder rückresorbiert werden kann. Dies impliziert einen chronischen oder intermittierenden Blutverlust über Wochen bis Monate. Ursachen für einen chronischen Blutverlust, der nach außen hin stattfindet, sind Endo- und Ektoparasiten,



Hämaturie, Epistaxis, Hämostasestörungen, sowie Blutungen der Haut oder in den Magen-Darmtrakt (WEISS, 2010; NAIGAMWALLA et al., 2012). Katzenflöhe sind weltweit die bedeutendsten, hämatophagen Ektoparasiten und verursachen vor allem bei massivem Befall von Jungtieren Eisenmangelanämien (RUST und DRYDEN, 1997; RUST, 2005). Gastrointestinale Blutungen können aufgrund primärer Erkrankungen (z. B. Neoplasien, Ulzerationen, arteriovenösen Fisteln) und Ulzera verursachender Medikamente (z. B. NSAID und Glukokortikoide) oder sekundär, aufgrund von systemischen Erkrankungen (z. B. Nephro-/Hepatopathie, Hypoadrenokortizismus, Hämostasestörungen) entstehen. In den verloren-gegangenen Erythrozyten sind große Mengen an Sauerstoff bindendem Eisen enthalten. Bei chronischen Blutungen, insbesondere inneren Sickerblutungen, verschlechtert sich das Allgemeinbefinden schleichend, da Katzen einen langsamen HCT-Abfall besser tolerieren können. Ein schwerer Eisenmangel ist durch eine mikrozytär-hypochrome Anämie mit unterschiedlichem Grad der Regeneration gekennzeichnet (NAIGAMWALLA et al., 2012). Ungefähr ein Drittel des Eisens im Körper ist in Myoglobin und in verschiedenen Enzymen gespeichert, den größten Anteil des Eisens enthält Hämoglobin. Die Hypochromasie entsteht durch eine Hemmung der Hämoglobinsynthese und die Mikrozytose durch vermehrte Mitosen der Normoblasten, die mit dem Mangel des intrazellulären Hämoglobins korreliert (STOHLMANN JR, 1964).

Bei Hunden und Katzen ist der Hämoglobingehalt in Retikulozyten (Literaturübersicht 1.1.2.) ein schneller und relativ verlässlicher Parameter, um eine Eisenmangelanämie aufzudecken, da er die Eisenverfügbarkeit für die Erythropoese unmittelbar widerspiegelt. In einer Studie wurde dies mithilfe des CHr (reticulocyte haemoglobin content) Wertes von ADVIA 120 (Siemens Medical Solutions, Fernwald, Germany) ermittelt. Der Cut-Off-Wert für den CHr beträgt 0,88 fmol bei Katzen mit einer Sensitivität von 93,8 % und einer Spezifität von 76,9 % (PRINS et al., 2009). Humanmedizinische Studien zeigten eine signifikante Korrelation zwischen dem Hämoglobingehalt der Retikulozyten, den jeweils der Sysmex XT-2100 (RET-He) und der ADVIA 120 (CHr) maßen (BRUGNARA et al., 2006; DAVID et al., 2006). Des Weiteren war dieser Parameter im Gegensatz zu der Ferritin Konzentration nicht fehleranfällig durch sekundäre entzündliche Erkrankungen (MARKOVIĆ et al., 2007).

Die Retikulozytenzahlen waren bei der Eisen-restriktiven Erythropoese grenzwertig niedrig oder erniedrigt und der mittlere Hämoglobingehalt der Retikulozyten fiel in der Humanmedizin unter einen Wert von 27,2 pg (BRUGNARA et al., 2006). Bei anhaltendem Eisenmangel nahm der Hämoglobingehalt in den Retikulozyten innerhalb von 48-72 Stunden ab. Diese Erscheinungen traten deutlich früher auf als die nach Wochen zu beobachtende Mikrozytose und Hypochromasie der Erythrozyten. Führt die Substitution von Eisen zu einem Therapieerfolg, sah man dies initial an einer Zunahme der IRF, einer Volumen- und Hämoglobinzunahme der Retikulozyten (BRUGNARA, 2000; THOMAS et al., 2013). In anderen humanmedizinischen Studien konnte die IRF jedoch auch signifikant zunehmen, je stärker der Eisenmangel ausgeprägt war. Die Zunahme war jedoch relativ zu einer Abnahme von der LFR. Es kam zu keiner gesteigerten Erythropoese, sondern der Gehalt an intrazellulärer Transferrin Rezeptor Messenger-RNA nahm bei Eisenmangel zu, was zu einer gesteigerten Fluoreszenz der cytoplasmatischen RNA führte (RAO et al., 1986; WELLS et al., 1992; CHOI und PAI, 2001).

## **2.2. Aregenerative Anämie**

Die aregenerative Anämie ist gekennzeichnet durch das Unvermögen des Knochenmarks, eine der Anämie angemessene Anzahl an Retikulozyten zu produzieren. Der hierfür verantwortliche Pathomechanismus kann extra- oder intramedullär lokalisiert sein (COUTO, 2001). Normalerweise hat die aregenerative Anämie ein normozytär-normochromes Erscheinungsbild. Die Retikulozytenzahlen und ihre Parameter sind erniedrigt oder fehlend und deuten auf eine Suppression der Erythropoese hin (COTTER, 2000; KOHN, 2001).

### **2.2.1. Pseudoaregenerative Anämie**

Akute Blutungen können durch den Organismus nicht sofort kompensiert werden, da eine Katze mindestens drei bis fünf Tage benötigt, bis erythrozytäre Vorläuferzellen im peripheren Blut erscheinen. Wird das Blut während dieses Zeitraums untersucht, macht es einen pseudoaregenerativen Anschein (HARVEY, 2008).

### **2.2.2. Extramedullär bedingte aregenerative Anämie**

Bei der extramedullär bedingten Anämie ist das Knochenmark in seinem physiologischen Zustand, ist jedoch aufgrund von im Folgenden beschriebenen extramedullären Faktoren in seiner Erythropoese gehemmt (COTTER, 2000). In

einer Studie wiesen drei von neun Katzen mit extramedullär bedingter, milder, aregenerativer Anämie keine Retikulozyten auf und die restlichen sechs hatten zwischen  $3,9 \times 10^9$  und  $29 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (ECKMANN, 2005).

#### **2.2.2.1. Anämie der chronischen / entzündlichen Erkrankungen**

Chronische Erkrankungen, entzündliche Erkrankungen und neoplastische Prozesse wirken limitierend auf die Regeneration des Knochenmarks. Das Auftreten der Anämie kann innerhalb von drei bis zehn Tagen stattfinden. Multiple Faktoren lösen die Erkrankung aus: ein reduziertes Ausschütten und Ansprechen auf EPO, eine Eisensequestration, eine Immunkomplexbildung und eine verkürzte Lebensspanne von Erythrozyten (WEISS et al., 1983; WEISS und KLAUSNER, 1988; WEISS und MCCLAY, 1988). In den meisten Fällen kommt es zu einer aregenerativen, normozytär-normochromen Anämie. Die Anämie ist meist mild bis moderat, kann sich jedoch innerhalb weniger Tage zu einer schwerwiegenden Anämie entwickeln. Die Retikulozytenzahl ist moderat erniedrigt. Die Absolutzahl der aggregierten Retikulozyten lag in einer Studie bei Katzen mit Abszess ( $n = 12$ ) zwischen 0 und 45.000 pro Mikroliter, mit Pyothorax ( $n = 6$ ) zwischen 0 und 84.450 sowie mit Fettnekrose ( $n = 3$ ) zwischen 3.270 und 33.600 pro Mikroliter (OTTENJANN et al., 2006). Die mögliche Eisen-sequestration führt zu einer verminderten Verfügbarkeit im Serum. Bei hoher gleichbleibender Entzündungsaktivität kann dies durch eine mikrozytär-hypochrome Anämie charakterisiert sein und initial durch vermehrtes Auftreten von hypochromen und später mikrozytären Retikulozyten erkannt werden. Das Vorliegen hypochromer Retikulozyten sollte als empfindlicher Indikator dienen (OTTENJANN et al., 2006).

Eine FeLV-Infektion kann nicht nur auf direktem Wege durch Beeinflussung der Erythropoese zu einer aregenerativen Anämie führen sondern auch durch FeLV-assoziierte chronische Erkrankungen. FeLV positive Katzen sind prädisponiert für sekundäre Erkrankungen, da das Virus zu einer schwerwiegenden Immunsuppression führt, die dem Ausmaß einer Infektion mit dem Feline Immunschwächevirus (FIV) überlegen ist. Hierzu gehören chronische systemische Infektionen und neoplastische Erkrankungen wie beispielsweise Lymphome und Leukämien. Diese Katzen zeigen meist eine milde Anämie mit einem HCT von 20–30 %. Wenn man die FeLV assoziierte chronische Erkrankung erfolgreich therapiert, steigt der HCT meist an (HARTMANN, 2006).

### **2.2.2.2. Erythropoetinmangel**

#### **2.2.2.2.1. Anämien bei chronischen Nierenerkrankungen**

Bei chronischen Nierenerkrankungen ist die EPO-Synthese zunehmend eingeschränkt. Somit kann bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck des Blutes nicht genügend EPO an den Rezeptoren der Vorläuferzellen der erythroiden Burst-bildenden Einheit (eBFU) binden, was die Ausdifferenzierung zu erythroiden Kolonie-bildenden Einheiten (eCFU) und schließlich zu den Erythrozyten hemmt (LANGSTON et al., 2003). Dieser Pathomechanismus ist der Hauptauslöser für die Anämie, allerdings kommen meist zusätzliche Faktoren hinzu. Häufig kommt es bei chronischen Nierenerkrankungen zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, welcher einen negativen Einfluss auf die Erythropoese und die Überlebenszeit der Erythrozyten hat (BOGIN et al., 1982). Harnpflichtige Stoffe, die aufgrund der chronischen Nierenerkrankung ungenügend ausgeschieden werden, können aufgrund ihrer toxischen Wirkung zu einer verringerten Lebensspanne der Erythrozyten führen, welche die Funktion von EPO und die Erythropoese einschränken. Des Weiteren bewirken die Urämietoxine eine primäre Hämostasestörung, was zu einer chronischen Blutungsanämien führen kann. Aufgrund der chronischen und entzündlichen Komponente sind auch die Übergänge zu der „Anämie der entzündlichen Erkrankungen“ fließend (MACDOUGALL, 2001).

Behandelt man Katzen mit chronischer Niereninsuffizienz mit Darbepoetin kommt es bei den Katzen, die auf die Therapie ansprechen, nach einer medianen Zeit von 21 Tagen zur adäquaten Knochenmarkantwort. Eine Retikulozytose von  $> 60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter tritt bei 64 % während der Behandlung auf. Der mediane Anstieg der Retikulozyten beträgt  $12,5 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (CHALHOUB et al., 2012).

In einer humanmedizinischen Studie wurden anämischen und chronisch nierenkranken Patienten Eisen intravenös appliziert und 48 Stunden später stieg das Volumen der Retikulozyten an. Wurde die Therapie unterbrochen, nahm auch das Retikulozytenvolumen schnell wieder ab und konnte somit als früher Indikator für die Entstehung von Erythrozyten mit mangelndem Eisengehalt dienen (BUTTARELLO et al., 2004).

#### **2.2.2.2.2. Fehlender Einfluss von Hormonen**

##### *Hypothyreose*

Die Hypothyreose ist eine seltene Erkrankung der Katze. Die hypothyreote Stoffwechsellaage führt zu einer geringeren Stimulation von erythrozytären Vorläuferzellen, einer verminderten Eisenbindungskapazität und zu Eisenmangel. Somit kann es in ungefähr 30 % der hypothyreoten Katzen zu einer milden, normozytär-normochromen, aregenerativen Anämie kommen (GRECO, 2006; PETERSON, 2013). Die Retikulozyten und ihre Parameter sind erniedrigt (ANTONIJEVIĆ et al., 1998).

##### *Hyperthyreose*

Die bei Katzen deutlich häufiger gesehene Hyperthyreose wird bei einer Großstadtpopulation in Deutschland mit Eingrenzung auf ein Mindestalter von 13 Jahren auf 25 % geschätzt (SASSNAU, 2006). Nur äußerst selten und bei schwerwiegender Erkrankung ist die Hyperthyreose mit einer aregenerativen Anämie assoziiert. Die genaue Ursache ist nicht bekannt, aber zusätzliche Faktoren wie Eisenmangel und eine Erschöpfung des Knochenmarks werden vermutet. Jedoch gibt es auch konträre Studien, die von einer gesteigerten Produktion von EPO berichten, welche zu einer milden bis moderaten Retikulozytose und damit Erythrozytose führen (THODAY und MOONEY, 1992b; MOONEY, 2001).

##### *Hypoadrenokortizismus*

Bei dem Hypoadrenokortizismus kommt es sekundär zu einer Knochenmarksuppression aufgrund des Hypokortisolismus. In 25 % der erkrankten Katzen kommt es zu einer milden, normozytär-normochromen, aregenerativen Anämie (STONEHEWER und TASKER, 2001; GRECO, 2007).

##### *Hypophyseninsuffizienz / Wachstumshormonmangel*

Bei der Hypophyseninsuffizienz kann aufgrund eines Wachstumsmangels das Knochenmark nicht ausreichend stimuliert werden. Es kann zu einer normozytär-normochromen, aregenerativen Anämie kommen (IVANOVA und ZELLER, 2009).

#### **2.2.2.3. Anämie durch Mangelzustände**

Die IRF hat in der Humanmedizin einen besonderen Stellenwert in der Therapiekontrolle bei Mangelerscheinungen. Steigt die IRF unter der Therapie an,

kann man von einem Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl in den nächsten Tagen ausgehen (D'ONOFRIO et al., 1996; HAIDEN et al., 2006).

#### **2.2.2.3.1. Vitaminmangel**

Cobalaminmangel und Folatmangel führen in seltenen Fällen zur Anämie. Cobalamin ist ein Koenzym in dem Folat-Metabolismus. Kommt es nun zu einem Folatdefizit, werden drei Nukleobasen und folglich DNA und RNA unzureichend synthetisiert. Bei einer Katze mit Cobalaminmangel ist eine normozytär-normochrome, aregenerative Anämie beschrieben, die vermutlich durch eine hereditäre Malabsorption verursacht wurde (VADEN et al., 1992). Bei einer Katze mit Folatmangel und makrozytärer Anämie ist man ebenfalls von einer angeborenen Ursache ausgegangen (MYERS et al., 1995). Allerdings konnte man bei Katzen in einer Studie keinen, in einer weiteren nur einen sehr geringen Zusammenhang zwischen diesen Mangelerscheinungen und einer Makrozytose feststellen (REED et al., 2007). Dagegen wurde bei einem Cobalaminmangel in der Humanmedizin eine Makrozytose der Retikulozyten (MCVr 107,14 fl +/- 5,71 fl) und der Erythrozyten (MCV 92,93 fl +/- 4,93 fl) mit einem Verhältnis  $> 1$  beschrieben. Bei einer erfolgreichen Therapie kam es zu einer Umkehr dieses Verhältnisses, da die erythrozytäre Halbwertszeit und somit auch die erythrozytäre Makrozytose von längerer Dauer war (BALCI et al., 2016).

#### **2.2.2.3.2. Mangel an Spurenelementen**

Neben der beschriebenen chronischen Blutungsanämie kann Eisenmangel auch durch unzureichende Aufnahme von Eisen entstehen. Im Duodenum wird das Eisen in reduzierter Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) absorbiert. Da vor allem Jungtiere und Welpen nur einen begrenzten Eisenspeicher besitzen und die Absorptionsrate limitiert ist, sind sie für eine Eisenmangelanämie prädisponiert (WEISER und KOCIBA, 1983a). Allerdings sind Mangelerscheinungen durch die modernen, der Altersklasse angepassten Futtermittel selten geworden (NAIGAMWALLA et al., 2012).

Bei Eisenmangel kommt es typischerweise zu einer Hypochromasie und Mikrozytose der Erythrozyten ( $< \text{MCV}$ ) und der Retikulozyten ( $< \text{MCVr}$ ). In der Humanmedizin ließ sich somit anhand des erniedrigten MCV (69,88 fl +/- 3,02 fl) und des erniedrigten MCVr (85,03 fl +/- 3,58 fl) diese Anämieform von Cobalaminmangel und Mischformen differenzieren (BALCI et al., 2016).

Um einen bestimmten Grundumsatz zu gewährleisten, braucht der Körper Energie und Stoffwechselprodukte, die er verarbeiten kann. Ein früher oft aufgetretener Mangelzustand bei Katzen war die Taurin-Unterversorgung durch kommerzielles Futtermittel. Taurin ist ein wichtiges Antioxidans. Ein Schutz vor oxidativer Schädigung von Erythrozyten ist bei Versuchstieren beschrieben (SHUYING et al., 2007).

Ein abnormaler Lebermetabolismus oder ein bei der Katze selten vorkommender Lebershunt führen aufgrund eines mangelhaften Eisentransportes und/oder vermehrter Eisenbindung in 15 % zu einer mikrozytär-normo- oder hypochromen, milden, aregenerativen Anämie. Zusätzliche Einflüsse sind Eisenmangel bei chronischen Erkrankungen, verkürzte Überlebenszeit von Erythrozyten, Koagulopathie und abnormer Fettstoffwechsel (RULAND et al., 2008).

### **2.2.3. Medullär bedingte aregenerative Anämie**

Bei der medullär bedingten aregenerativen Anämie liegt eine Funktionsstörung direkt im Knochenmark vor, da es pathologisch verändert ist (EVANS und GRUFFYDD-JONES, 1984). Des Weiteren kann das Knochenmark bei Reifungsstörungen eine Hyperplasie aufweisen. Proliferationsstörungen führen dagegen zu einer Hypoplasie (TRAVLOS, 2006). In einer Studie wiesen sieben von neun Katzen mit intratramedullär bedingter, aregenerativer Anämie keine Retikulozyten auf und die restlichen zwei hatten  $3,47 \times 10^9$  und  $7,38 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (ECKMANN, 2005).

#### **2.2.3.1. Isolierte Anämie**

##### **2.2.3.1.1. Anämie der erythroiden Hypo-/Aplasie**

Bei einer isolierten erythroiden Hypoplasie oder Aplasie ist die Knochenmarkproduktion der erythrozytären Vorläuferzellen eingeschränkt oder fehlend. Die restlichen Zelllinien sind nicht betroffen (WEISS, 2009).

##### *Pure Red Cell Aplasia*

Der Subtyp FeLV-C/Sama-Stamm ist verantwortlich für eine PRCA, indem er mittels seines speziellen Hüllproteins gp70 mit dem Oberflächenrezeptor von erythroiden Vorläuferzellen interagiert und die Differenzierung von eBFU in eCFU unterbindet (ABKOWITZ et al., 1987; QUACKENBUSH et al., 1990). Daher sind die eCFU in Knochenmarkuntersuchungen nicht mehr auffindbar,

wohingegen trotz infizierter Vorläuferzellen anderer Zellreihen (Granulozyten und Makrophagen) diese in ihrer weiteren Ausreifung nicht beeinflusst werden (ABKOWITZ et al., 1986; ABKOWITZ et al., 1987). Die Katzen zeigen üblicherweise eine schwere aregenerative Anämie mit einem HCT unter 15 % und eine Makrozytose (HOOVER et al., 1974). Die Makrozytose ist Folge eines FeLV assoziierten Mitose-Defekts, weshalb das gleichzeitige Fehlen von Retikulozyten charakteristisch für eine FeLV-C Infektion ist (TESTA et al., 1983; WEISER und KOCIBA, 1983b).

#### **2.2.3.1.2. Aregenerative immunmedierte hämolytische Anämie**

##### *Feline Leukämievirus-Infektion*

Die Anämie, vor allem die am häufigsten auftretende aregenerative Anämie, ist neben der Neoplasie die relevanteste Komplikation einer FeLV-Infektion. Es werden sekundäre Autoantikörper gegen körpereigene Erythrozytenvorläuferzellen gebildet (HARTMANN, 2006). Oft zeigen infizierte Katzen zusätzlich eine immunmedierte Thrombozytopenie, welche eine pathologische Form, Größe und Funktion der Thrombozyten mit sich führt und meistens Blutungen hervorrufen kann (SHELTON und LINENBERGER, 1995).

##### *Feline Infektiöse Peritonitis*

Die feline infektiöse Peritonitis (FIP) gehört zu den weltweit verbreiteten und äußerst bedeutsamen Infektionskrankheiten, da die FIP im Vergleich zu den anderen Infektionskrankheiten die höchste Mortalitätsrate besitzt (HOLZWORTH, 1963). Das Feline Enterale Coronavirus (FECV) führt bei der Katze lediglich zu inapparenten Darminfektionen; kommt es allerdings zu einer Mutation, entsteht das FIP-Virus (VENNEMA et al., 1998). Immunsupprimierte oder junge Katzen, die vor allem in einem Mehrkatzenhaushalt leben, sind anfälliger für Mutationen aufgrund der gesteigerten Replikation der Coronaviren (FOLEY et al., 1997). FIP führt bei 65 % zu einer geringgradigen Anämie. Diese kann auf eine aregenerative sIMHA (THRALL et al., 2004; KOHN et al., 2006; FATHI et al., 2009) oder auf die Anämie der chronischen Erkrankungen zurückzuführen sein (ADDIE und JARRETT, 2006).

#### **2.2.3.1.3. Dyserythropoese**

Wenn mehr als 50 % der kernhaltigen Knochenmarkzellen erythrozytäre Vorläufer und mehr als 30 % der nicht erythroiden Zellen Myeloblasten sind, liegt



sehr wahrscheinlich eine Dyserythropoese vor. Weitere Anzeichen sind Zwei- oder Mehrkernigkeit, Megaloblasten, fragmentierte, unregelmäßige oder verbundene Kerne und asynchrone Zellreifung (WEISS, 2006b). Siderozyten, abnorme Erythrozyten mit basophilen Granula, und abnorme Sideroblasten, kernhaltige erythroide Zellen im Knochenmark, weisen auf eine gestörte Erythropoese hin (BAKER und VALLI, 1986). Dyserythropoese ist beim Hund auch durch eine Therapie mit Chloramphenicol (HARVEY et al., 1985), eine Intoxikation mit Arsen (FEUSSNER et al., 1979) und eine Infektion mit Leishmaniose (DE TOMMASI et al., 2014) beschrieben worden. Beim Englischen Springer Spaniel ist eine angeborene Dyserythropoese bekannt (HOLLAND et al., 1991). Bei Katzen liegen nach Wissen der Autorin noch keine entsprechenden Studien vor.

#### **2.2.3.2. Anämie mit Leukopenie und/oder Thrombozytopenie**

##### *Hypo-/Aplastische Anämie*

Eine hypoplastische oder aplastische Anämie ist gekennzeichnet durch zellarme Knochenmarkbiopsien, die mehr oder weniger durch Fett ersetzt sind (WEISS, 2000). Pathophysiologische Abläufe wie genetische Mutationen, Dysregulation von hämatopoetischen Zytokinen, Zerstörung und verringerte Bildung von Stamm- oder Vorläuferzellen sowie ein fehlerhafter Aufbau des Bindegewebsgerüsts führen zu einer Panmyelopathie (WEISS, 2000). Verschiedene Erkrankungen wie FeLV-C, Parvovirose, FIV, eine chronische Ehrlichiose, CNI, eine bakterielle Septikämie und Endotoxämie sowie verschiedene Medikamentenreaktionen (Literaturübersicht 2.2.3.2.2.) können eine aplastische Anämie hervorrufen (PETERSON et al., 1988; WEISS, 2000). In einer retrospektiven Studie bei Katzen wurden in acht Jahren von 128 Knochenmarkbiopsien 13 Fälle mit aplastischer Anämie diagnostiziert. Definitionsgemäß war in diesen Fällen das Knochenmark in über 95 % einer Stanzbiopsie oder eines „unit particle“ (Teilpartikels) durch Fettgewebe ersetzt und das periphere Blut zeigte eine Bi- oder Panzytopenie. Als häufigste Ursache wurden eine CNI und eine idiopathische aplastische Anämie diagnostiziert. In beiden Fällen spielt sehr wahrscheinlich eine Anorexie beziehungsweise Kachexie eine Rolle (WEISS, 2006a). Der Grad der Anämie kann schwerwiegend sein, jedoch überwiegen die durch Thrombozytopenie und Leukopenie ausgelösten Komplikationen. In einer humanmedizinischen Studie wurde Ratten 5-Fluorouracil verabreicht und die Retikulozyten wurden mikroskopisch und mittels Fluoreszenzzytometrie

ausgezählt. Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass die IRF ein früher Parameter ist, um die Myelosuppression und Regeneration nach chemischen Insulten aufzuzeigen (KAKIUCHI et al., 2006). Eine weitere humanmedizinischen Studie zeigte, dass die HFR mit einem Wert von  $> 5 \%$  der früheste Marker war um das erfolgreiche Ansprechen von Patienten mit aplastischer Anämie auf eine immunsuppressive Behandlung anzuzeigen (SICA et al., 1999).

#### **2.2.3.2.1. Infektionen**

##### *Feline Leukämievirus-Infektion*

Das FeLV kann auch Knochenmarkstammzellen und Stromazellen infizieren, was eine Knochenmarksuppression zur Folge hat (COTTER, 1998). Die Knochenmarksuppression kann direkt durch Virusvermehrung im Knochenmark oder durch die Integration von Virus DNA in die Wirt DNA infizierter Vorläuferzellen verursacht werden. Eine schwere aplastische Anämie kann ebenfalls durch eine FeLV-Infektion ausgelöst werden, die alle Zelllinien betrifft. Häufig werden panzytopenische Katzen FeLV positiv getestet (HARTMANN, 2006). Eine latente Infektion hingegen spielt kaum eine Rolle bei aregenerativen Cytopenien (STÜTZER et al., 2010). Linenberger konnte in seiner Studie zeigen, dass es zu einem Umbau der Zytokin-Messenger-RNA kommen kann. Folglich ist die Produktion der Proteine beeinflusst, die für die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen verantwortlich sind (LINENBERGER und DENG, 1999). Die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Zellen können bei manchen Katzen in zyklischen Abständen beeinträchtigt werden und somit zu periodischer Abnahme von Erythrozyten, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten führen (HARTMANN, 2006). Das aplastische Knochenmark zeigt bei der zytologischen Untersuchung üblicherweise nekrotische Veränderungen oder eine Hypozellularität und kann eventuell als fortgeschrittenes Stadium einer PRCA angesehen werden (SHIMODA et al., 2000; HARTMANN, 2006).

##### *Immunschwäche*

Das FIV gehört zu der Familie der Retroviridae, Subfamilie Lentivirinae. Es kommt weltweit vor, wobei je nach Region gewisse Subtypen dominieren (PECORARO et al., 1996). So dominiert in Deutschland von den möglichen Subtypen (A, B, C, D, E) vor allem die Subtypen A, B und C (STEINRIGL und KLEIN, 2003). Der Biss gehört zu dem Hauptübertragungsweg, da das Virus über

die Blutbahn zu fast 100 % übertragen wird (MATTEUCCI et al., 1993). Aus diesem Grund kommt das Virus bei den aggressiveren, männlichen, vor allem unkastrierten und älteren Katzen häufiger vor und ist in Deutschland mit einer Prävalenz von 2–3 % insgesamt selten (COURCHAMP et al., 1998; ARJONA et al., 2000; MUIRDEN, 2002).

Eine Anämie tritt bei dem FIV mit 18 % deutlich seltener auf als bei dem FeLV (40 %) und ist auch deutlich milder (SPARKES et al., 1993). Die Granulopoese wird stärker als die Erythropoese gehemmt (SHELTON und LINENBERGER, 1995). Meist ist die Anämie aufgrund von dysplastischen Veränderungen des Knochenmarks aregenerativ, wobei es seltener auch zu einer sIMHA kommen kann (SHELTON et al., 1991).

#### *Parvovirose*

Die feline Panleukopenie wird durch das feline Parvovirus (FPV) ausgelöst und gehört zu der Familie der Parvoviridae. Die Viren greifen bevorzugt schnell teilende Darmzellen und Knochenmark-Vorläuferzellen mit einer kurzen Überlebenszeit an. Da die erythrozytären Vorläuferzellen nicht primär angegriffen werden und die Erythrozyten eine vergleichsweise lange Überlebensspanne haben, kommt es meist nur zu einer geringgradigen Anämie, die durch Dehydratation maskiert sein kann (KRUSE et al., 2010). Aplastische Anämien sind beschrieben (WEISS und EVANSON, 2000). Weitere Auslöser einer Anämie wie eine Entzündung und schwere intestinale Blutungen können das Krankheitsgeschehen beeinflussen (KRUSE et al., 2010).

#### **2.2.3.2.2. Toxine**

Gewisse zytostatische Chemotherapeutika können das Knochenmark in einem solchen Ausmaß supprimieren, dass eine vorhersehbare, Dosis abhängige und normalerweise reversible aplastische Anämie die Folge ist. Hierzu gehören beispielsweise Azathioprin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Hydroxyurea und Vinblastin (WEISS, 2000). Andere Medikamente, die ebenfalls einen aplastischen Effekt auf das Knochenmark ausüben, sind Albendazol, Chloramphenicol, Methimazol und Griseofulvin. Die Organophosphat- und Phenolvergiftungen kommen äußerst selten beim Kleintier vor, können aber auch zu einer Knochenmarkaplasie führen (PETERSON et al., 1988; BISWAS et al., 1991; COTTER, 2000; WEISS, 2000; KOHN et al., 2003).

### **2.2.3.2.3. Strahlung**

Gewebe mit kaum differenzierten Zellen ist radiosensibler als Gewebe mit reifen Zellen, weshalb blutbildendes Gewebe (lymphatisches Gewebe und Knochenmark) die höchste Strahlungsempfindlichkeit besitzt. Die Dosis letalis, die zum Zelltod führt, beträgt beim Knochenmark 7 Gray (SCHITTENHELM, 1939; MARSH und GEARY, 1991). Leukozyten, beziehungsweise Lymphozyten, sind am anfälligsten für Röntgenstrahlung und treten als erstes in verminderter Anzahl auf (WINTZ und WITTENBECK, 1935).

### **2.2.3.2.4. Myelodysplastisches Syndrom**

In der Humanmedizin ist das MDS definiert als „eine durch ineffektive Hämatopoese gekennzeichnete klonale Störung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, die zu Zytopenien im Blut führt (FENAUX, 1996). Folglich ist das MDS durch ein normo- oder hyperzelluläres, dysplastisch verändertes Knochenmark und eine Zytopenie im peripheren Blut gekennzeichnet (SHIMODA et al., 2000). Im Knochenmark des Menschen können verschiedene morphologische Veränderungen wie megaloblastoide Rubrizyten, Ring-Sideroblasten, hyposegmentierte Neutrophile und Mikromegakaryozyten als signifikante dysplastische Veränderungen angesehen werden (HISASUE et al., 2001). Viele dysplastische Veränderungen treten auch bei der Katze auf, wurden allerdings noch nicht als diagnostische Kriterien definiert (GRINDEM et al., 1985; RASKIN, 1996). Es liegt keine einzelne Krankheit vor, sondern ein Symptomenkomplex. Eine milde bis schwere aregenerative Anämie kann als häufigste hämatologische Abnormalität bei Katzen mit MDS angesehen werden und kommt häufiger vor als eine Thrombozytopenie und eine Neutropenie (SHIMODA et al., 2000; HISASUE et al., 2001). Bei der jungen bis mittelalten Katze tritt MDS relativ häufig auf und kann als Präleukämisches Stadium in eine akute Leukämie übergehen (FENAUX, 1996; SHIMODA et al., 2000; HISASUE et al., 2001). Die in der Humanmedizin angewandte French-American-British Klassifikation findet auch Anklang in der Tiermedizin und dient zur Prognosefindung. Das MDS der Katze ist in fünf Untergruppen unterteilt, der Refraktären Anämie (RA), der Refraktären Anämie mit Ring-Sideroblasten (RARS), der Refraktären Anämie mit Überschuss an Blasten (RAEB), der RAEB in Transformation (RAEB in T) und der chronisch myelomonozytischen Leukämie (HISASUE et al., 2001; HISASUE et al., 2009). RA hat weniger als 6 % Myelo-

blasten, wohingegen RAEB 6–30 % besitzt. Die RA und die IMHA können aufgrund der bei beiden vorkommenden Metarubrizyten und der Autoagglutination leicht verwechselt werden. Die RA scheint besser auf die Therapie anzusprechen und hat eine viel längere Überlebenszeit als die RAEB, bei der EPO und andere hämatopoetische Wachstumsfaktoren nicht greifen. Die RARS ist charakterisiert durch mikrozytäre oder hypochrome aregenerative Anämie mit Siderozyten oder Sideroblasten im Blut und Ring-Sideroblasten im Knochenmark, und sollte nicht mit einer chronischen Eisenmangelanämie verwechselt werden (WEISS, 2006c; WEISS, 2009). Die absolute Retikulozytenzahl kann normal oder erniedrigt sein, wohingegen die IRF erhöht sein kann. Dementsprechend lag in einer humanmedizinischen Studie die absolute Retikulozytenzahl je nach MDS Subtyp bei  $63,0\text{--}81,0 \times 10^9/l$  und die IRF bei 19,3–25,4 % (TORRES GOMEZ et al., 2003).

Einige Fälle von dem MDS treten wie so viele andere Blutbildveränderungen FeLV-assoziiert auf und resultieren aus der FeLV induzierten Stammzellmutation (VALENTIANO et al., 2010). Man geht davon aus, dass „long terminal repeats“ (LTR)-Strukturen, die direkte „enhancer“ (URE)-Wiederholungen besitzen für das Auslösen von dem MDS verantwortlich gemacht werden können (HISASUE et al., 2009). Auch bei Katzen, die an einer FIV-Infektion erkrankten, wurden dysplastische Veränderungen des Knochenmarks festgestellt (SHELTON et al., 1991). Dies geht mit einer granulozytären, erythrozytären Hyperplasie und lymphozytären Aggregaten im Knochenmark einher (BREUER et al., 1998).

#### **2.2.3.2.5. Sekundäre Dysmyelopoese**

Gewisse auslösende Faktoren wie eine IMHA, eine immunmedierte Thrombozytopenie, ein Lymphom oder eine Chemotherapie können bei Katzen zu einer sekundären Dysmyelopoese führen. Um das MDS von dieser sekundären Form zu unterscheiden, besitzt das Knochenmark bei dem MDS eine vermehrte Anzahl an Myeloblasten und Rubriblasten, wohingegen die sekundäre Dysmyelopoese Anzeichen einer assoziierten Erkrankung aufweist (WEISS, 2009).

#### **2.2.3.2.6. Knochenmarktumor**

Lymphoproliferative und myeloproliferative Erkrankungen sind Störungen, die von soliden Geweben herrühren und sich in verschiedenen Formen der Leukämie, des Lymphoms, des multiplen Myeloms und des malignem Histiozytoms präsentieren (WILLARD und TVEDTEN, 2006).

### *Lymphom*

In den 1990er Jahren wurde in Studien herausgefunden, dass bei Katzen 90 % aller bösartiger Neoplasien des hämatopoetischen Gewebes maligne Lymphome sind. Bei Katzen können alle Lymphome das Knochenmark infiltrieren, dabei ist das Stadium V erreicht. Mindestens 50 % der Katzen mit Lymphom zeigen eine mittelgradige bis schwere Anämie (WITHROW und VAIL, 2007). Da die Prävalenz von FeLV in den letzten 20–30 Jahren weltweit gesunken ist, sind auch Lymphome weniger auf die Infektion mit FeLV zurückzuführen (HARTMANN, 2006; MEICHNER et al., 2012). Katzen, die mit dem Subtyp FeLV-A und FeLV-B infiziert sind, haben ein höheres Risiko Lymphome, vor allem T-Zell-Lymphome, oder myeloproliferative Erkrankungen zu bekommen (TZAVARAS et al., 1990; HARTMANN, 2006). FeLV hat selbst kein onkogenes Potential, allerdings können durch Einbau des Virusgenoms in das Wirtsgenom Protoonkogene aktiviert werden (HARTMANN, 2006). Des Weiteren können durch Rekombinationen mit Protoonkogenen, wie z. B. MYC und TRC, neue Varianten, FeLV-MYC oder FeLV-TCR, entstehen (TERRY et al., 1992) oder auch Varianten wie das feline Sarkomvirus (FeSV) (HARTMANN, 2006).

### *Leukämie*

Katzen mit einer akuten Leukämie zeigen normalerweise eine schwere aregenerative Anämie mit blassen Schleimhäuten auf, wohingegen die chronische Leukämie zu einer milden Anämie führt und eine Splenomegalie nicht zwangsläufig vorkommen muss (WITHROW und VAIL, 2007). Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die am häufigsten auftretende Form bei Katzen (COTTER und ESSEX, 1977), welche zu 60–80 % Träger des FeLV sind (WILLARD und TVEDTEN, 2006). Eine moderate bis schwere Anämie und eine hochgradige Infiltration von Lymphoblasten in Knochenmarkaspiraten sind diagnostische Merkmale. Eine chronische lymphoblastische Leukämie ist bei Katzen nur äußerst selten beschrieben. Sie weisen im Blut eine Leukozytose auf und sind meist FeLV negativ. Auch die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Leukämieformen sind sehr selten diagnostiziert bei Katzen. Die myelomonozytäre Form hingegen, bei der neutrophile Granulozyten und Monozyten maligne entartet sind, ist nach der ALL eine häufiger beschriebene Form (WITHROW und VAIL, 2007).

In der Humanmedizin ist die IRF ein früher Parameter, um das Ansprechen von Leukämiepatienten auf die Chemotherapie festzustellen. Eine Knochenmarkregeneration wurde bei einem IRF-Wert von  $> 5 \%$  und nach einer medianen Zeit von 16 Tagen erreicht. Somit war die IRF dem Anstieg der absoluten Neutrophilenzahl von  $> 0,1 \times 10^9/l$  überlegen, die für das Ansprechen der Therapie im Median 23 Tage benötigte (RAJA-SABUDIN et al., 2014).

Es ist zu berücksichtigen, dass sowohl in einer humanmedizinischen Studie mit Leukämiepatienten als auch bei einem Hund mit Leukämie der Wert der HFR fälschlich hoch war. Bei dem Hund wurde die HFR von 66 % angegeben (TVEDTEN, 2011). In der humanmedizinischen Studie hatten fünf von elf Leukämiepatienten eine abnormal erhöhte IRF, jedoch wurde nur bei drei eine Fehlermeldung mit abnormalem Retikulozytenscattergramm angezeigt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Leukozyten bei Leukämiepatienten schlechter mit Fluoreszenzfarbstoff anfärben könnten. Daher fallen sie in den Bereich der Retikulozyten und werden fälschlicherweise als IRF detektiert (HUH et al., 2007).

### *Multiples Myelom*

Das multiple Myelom ist eine maligne Proliferation von Plasmazellen, die primär das Knochenmark betrifft, aber auch andere Organe betreffen kann (PATEL et al., 2005). Bei der Katze kommt dieser Tumor in  $< 1 \%$  aller bösartigen Tumoren vor (SAVARY et al., 2000). Neben der aregenerativen Anämie sind Hyperproteinämie und Hyperglobulinämie mit monoklonaler Gammopathie und Thrombozytopenie typische Blutbildveränderungen. Die Anämie kann neben der Myelosuppression auch aufgrund eines konsekutiven Nierenversagens auftreten. Außerdem können aufgrund der Immunsuppression und der verminderten Anzahl an normalen Immunglobulinen die vermehrt vorkommenden Paraproteine die Oberfläche der Erythrozyten besetzen und zu einer HA führen. Die Paraproteine können aber auch die Koagulation der Thrombozyten stören und so zu einer Blutungsanämie führen (WEBER und TEBEAU, 1998). Auch Hyperviskosität und Erythrophagozytose können die aregenerative Anämie verursachen.

In einem Fallbeispiel lag die absolute Retikulozytenzahl bei einer Katze mit multiplem Myelom bei  $11 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter (WEBB et al., 2008). In einer humanmedizinischen Studie dient die IRF dazu, frühzeitig den Therapieerfolg einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation aufzuzeigen.

Dies wurde unter anderem an drei Patienten mit multiplem Myelom veranschaulicht. Mithilfe des IRF-Wertes von  $> 10\%$  konnte nach einer medianen Zeit von neun Tagen von einem Ansprechen auf die Transplantation ausgegangen werden (TORRES et al., 2001).

#### **2.2.3.2.7. Myelophthistische Anämie**

Myelophthistische Funktionsstörungen sind durch den Austausch von normalen hämatopoetischen Zellen mit abnormalen Zellen gekennzeichnet, welche metastatischer Herkunft sein können (MURPHY et al., 1989). Sie können von einer myeloischen oder lymphatischen Leukämie (NAJMAN et al., 1991), einem multiplen Myelom, einem systemischen Mastzelltumor (BRADA et al., 1996), einer granulomatösen Entzündung (wie der Histoplasmose) oder einer Myelofibrose herrühren. Die Zellen werden nicht nur verdrängt, sondern verändern auch die molekularen Mechanismen, sodass die physiologische Erythropoese eingeschränkt ist (SIETSMA et al., 1999).

Bei einer Myelofibrose wird das Knochenmark durch Fibroblasten, Kollagen oder Retikulinfasern verdrängt, was zahlreiche Ursachen haben kann und weshalb für die Diagnostik eine histopathologische Untersuchung mittels Stanzbiopsie durchgeführt werden sollte. Myelofibrose wurde in FeLV positiven Katzen diagnostiziert und direkt mit dem Virus in Zusammenhang gebracht (HOOVER und KOCIBA, 1974; HARVEY et al., 1978). Das FeLV kann auch aufgrund einer chronischen Stimulation der Fibroblastenproduktion im Knochenmark zu einer Myelofibrose führen. Diese abnormale hyperplastische oder neoplastische Regeneration kann in schweren Fällen in einer Fibrosierung der gesamten Knochenmarkhöhle mit dem sie umgebenden Endosts resultieren (HARTMANN, 2006). Des Weiteren kann durch ein chronisch entzündetes Rückenmark, durch einen primären Tumor der Stromazellen des Knochenmarks oder idiopathisch eine Fibrosierung stattfinden (BREUER et al., 1999; WEISS, 2008).

Eine mäßige bis schwere aregenerative Anämie gehört zu den typischen Laborveränderungen, sie ist normozytär und normochrom, kann aber in Bezug auf FeLV auch makrozytär sein (THOMPSON, 2003; HARTMANN, 2006).





### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Blutproben

Für den Methodenvergleich wurden Blutproben 50 anämischer Katzen verwendet. Mittels des klinikeigenen maschinellen Hämatologie-Analysegeräts Sysmex XT-2000iV wurde von Januar 2013 bis März 2014 mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) antikoaguliertes Vollblut von Katzen analysiert, die in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt worden waren. Blutproben mit einem  $HCT \leq 28 \%$  wurden einbezogen. Aufgrund häufiger Verwendung in der Literatur wurde eine Anämie ab dem Messwert von  $> 40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter als regenerativ definiert (GIGER, 2000a; TVEDTEN und WEISS, 2000; KOHN, 2001). Da sowohl Katzen mit aregenerativer als auch regenerativer Anämie einbezogen wurden, umfassten die Retikulozytenzahlen den Wertebereich von niedrigen bis hohen Retikulozytenwerten als Grundvoraussetzung für einen guten Methodenvergleich. Die Blutröhrchen wurden auf einen Blut-Rollen-Mischer gelegt um ein ausreichendes Vermischen aller Blutbestandteile sicher zu stellen. Alle Blutproben, bei denen das Analysegerät Sysmex XT-2000iV eine Fehlermeldung ausgab, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Fehlermeldungen sind z. B. auf ein zu geringes Blutvolumen, eine zu geringe Zellzählung oder unzuverlässige Daten (z. B. unzureichende Differenzierung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten aufgrund ihrer Zellgröße) zurückzuführen. Von allen 50 Blutaustriichen wurden ein Routine Blutaustrich mit modifizierter Wright's Färbung (Bayer Hema-Tek 2000 Slide Stainer) und eine Supravitalfärbung für die manuelle Zählung angefertigt. Die Objektträger wurden auf mögliche Interpretationsschwierigkeiten für die Zellzählung untersucht. Die Interpretation der Zelldifferenzierung kann z. B. durch intrazelluläres Material wie Blutparasiten eingeschränkt werden. Lediglich innerhalb einer Stunde ausgestrichene und gefärbte Blutproben wurden für die manuelle Zählung verwendet.

Die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik sollten auch bei Klinikpatienten untersucht werden, die im Hämogramm keine Hinweise auf eine Anämie aufwiesen. In einem zusätzlichen retrospektiven Teil wurden daher die Laborergebnisse des EDTA antikoagulierten Vollblutes von Katzen untersucht,

deren Blutbild in dem gemeinsamen Labor der Medizinischen und Chirurgischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München von August 2011 bis August 2013 von dem Analysegerät Sysmex XT-2000iV analysiert wurde. Diese Daten wurden in Excel (Excel 2007, Version 12.0, Microsoft Corporation) konvertiert und dort validiert. Proben mit Fehlermeldungen aufgrund technischer oder analytischer Fehler wurden ausgeschlossen. Bei Patienten mit Mehrfachmessungen wurde lediglich die erste Messung übernommen und die weiteren Messungen ausgeschlossen. Proben ohne Retikulozytenmessungen wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Die validierten Daten wurden in das Statistikprogramm Statistical Package for Social Science, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) exportiert. In SPSS wurden die Daten nach folgenden, von der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Katze festgelegten, Referenzwerten gefiltert (Tabelle 1). Somit hatten die in die Statistik einbezogenen Katzen in Anbetracht der RBC, des HGB und des HCT keinen Hinweis auf eine Anämie und in Anbetracht der weiteren Parameter ein physiologisches rotes Blutbild. Leukozyten- und Thrombozytenzahlen wurden zudem berücksichtigt, da Thrombozytenaggregate und Leukozytosen die Retikulozytenwerte verfälschen können (VILLAMOR et al., 1996; HUH et al., 2007). Alle Katzen, die diese Voraussetzungen erfüllten, werden im Folgenden als nicht anämische Katzen bezeichnet.

**Tabelle 1: Referenzwerte der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.**

<b>WBC (<math>10^9/l</math>)</b>	6-11
<b>RBC (<math>10^{12}/l</math>)</b>	5-10
<b>HGB (mmol/l)</b>	5,6-9,3
<b>HCT (l/l)</b>	0,33-0,44
<b>MCV (fL)</b>	40-55
<b>MCH (fmol)</b>	0,8-1
<b>MCHC (mmol/l)</b>	19-22
<b>PLT (<math>10^9/l</math>)</b>	180-550

(\*) WBC = Leukozyten; RBC = Erythrozyten; HGB = Hämoglobin; HCT = Hämatokrit; MCV = mittleres Erythrozytenvolumen; MCH = mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt in einem Erythrozyten; MCHC = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten ; PLT = Thrombozyten

Anhand der gefilterten Daten wurde von den Retikulozyten und deren Parametern LFR, MFR, HFR, IRF Wertebereiche erstellt. Wegen der besseren Aussagekraft wird der absolute Retikulozytenwert dem relativen Retikulozytenwert vorgezogen (NEBE et al., 2010). Aus diesem Grund wurden auch die Retikulozytenparameter LFR, MFR, HFR und IRF des Sysmex XT-2000iV anhand ihrer relativen Häufigkeit in Prozent der Gesamtreikulozyten in die jeweilige Absolutzahl ( $10^9/l$ ) umgerechnet. Aus dieser Stichprobe von repräsentativen felineen Klinikpatienten ohne Anämie, wurden diejenigen, die einen Wert von über  $60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter aufwiesen, näher untersucht. Mithilfe der klinischen Datenbank (Vetera®.net GP Software) wurden dieser Gruppe nicht anämischer Katzen mit einer Retikulozytose diagnostizierte Krankheitsbilder zugeordnet. Der Einfluss des Signalelements auf die Retikulozytenanalytik wurde nicht erneut untersucht, da in früheren Untersuchungen weder Geschlecht, noch Alter oder Gewicht einen signifikanten Einfluss auf die Retikulozyten zeigten (MORITZ et al., 2004; GRANAT et al., 2014).

## **2. Manuelle Auszählung**

Für die manuelle Retikulozytenzählung wurden 100  $\mu$ L EDTA antikoaguliertes Vollblut für 20 Minuten mit 100  $\mu$ l des 1 %-igen Brilliantkresylblaus (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Eschborn, Germany), einer Supravitalfärbung, inkubiert. Nach der Inkubation wurde die jeweilige Probe auf zwei Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Präparate unter dem Mikroskop betrachtet und innerhalb des Monolayers unter Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung wurden 1000 kernlose Erythrozyten ausgezählt. Eine Zelle wurde als ein aggregierter Retikulozyt definiert, wenn sich die RNA-Reste in der Zelle durch mehr als 15 Punkte darstellen ließen, oder wenn man ein oder mehrere aggregierte Punkte auffinden konnte. Zellen mit bis zu 15 punktförmigen RNA-Resten wurden als punktierte Retikulozyten definiert (LILLIEHOOK und TVEDTEN, 2009). Die Anzahl der punktierten und aggregierten Retikulozyten pro 1000 kernlosen Erythrozyten wurde in ihre Relativzahl (%) umgerechnet und durch die Multiplikation mit der Gesamterythrozytenzahl des Sysmex in ihre Absolutzahl ( $10^9/l$ ) umgerechnet, um diese für die statistischen Analysen vergleichbar zu machen. Als Gesamtreikulozytenzahl der manuellen Auszählung wurde dabei die Summe aus aggregierten und punktierten Retikulozyten verwendet.

### 3. Maschinelle Auszählung des Sysmex XT-2000iV

Das Hämatologie-Analysegerät Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) nutzt die Fluoreszenz-, Lichtstreuung- und Impedanzmessung als vollautomatische Messtechnologien. Um ein ausreichendes Mischen der EDTA-Proberöhrchen zu gewährleisten, werden sie vor dem Messvorgang auf einem Blut-Rollen-Mischer geschwenkt. Nachdem mit einem Lysereagenz die Zellmembran perforierbar gemacht wurde, werden die Retikulozyten mit dem fluoreszierenden Farbstoff Polymethin gefärbt, welcher sich spezifisch an die zytoplasmatische RNA bindet. Mit Hilfe des optischen Verfahrens der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und eines Halbleiter-Laser werden die Retikulozyten gezählt. Das Vorwärts-Streulicht sendet Signale aus, die die Zellgröße wiedergeben. Das Seitwärts-Fluoreszenzlicht verhält sich proportional zu dem zytoplasmatischen RNA-Gehalt. Basierend auf der RNA-Menge werden die Retikulozyten in LFR, MFR und HFR unterteilt. Diese Subgruppen reflektieren den Reifezustand der Retikulozyten (KOEPEKE, 1991). Daher ergeben die jungen Retikulozyten, IRF genannt, die Summe aus der MFR und der HFR. Das Messsignal für die IRF liegt weiter aufwärts der X-Achse als das Messsignal der LFR (Abbildung 1). Die Erythrozyten werden mittels Impedanzmessung erfasst und lassen sich durch den unterschiedlichen RNA-Gehalt von den Retikulozyten trennen. Der HCT wird auf Basis des Erythrozytenvolumens mit der Impulshöhensummierung berechnet (SYSMEX, 2008).

Das Analysegerät Sysmex XT-2000iV zählt eine deutlich höhere Zellzahl aus, als dies bei der manuellen Auszählung möglich ist. Anhand folgender Formeln, können Rückschlüsse auf die tatsächlich ausgezählte Anzahl von Retikulozyten und Erythrozyten geschlossen werden. In die Formeln sind das Verdünnungsverhältnis, die Probenmenge und der analysierte Wert der Retikulozyten (= RET (Sysmex)) und Erythrozyten (= RBC (Sysmex)) pro Mikroliter einbezogen.

$$\text{Maschinell ausgezählte RET} = \frac{\text{RET}(\text{Sysmex})}{255} * 2,8$$

Verdünnungsverhältnis: 1:255 Probenmenge in µl: 2,8
--

$$\text{Maschinell ausgezählte RBC} = \frac{\text{RBC}(\text{Sysmex})}{500} * 11,7$$

Verdünnungsverhältnis: 1:500 Probenmenge in µl: 11,7
---

**(nach Hersteller Informationen)**

Einmal täglich wurde die Qualitätskontrolle auf dem Level Zwei durchgeführt (Sysmex e-Check Haematology Control for the Sysmex X-Series Analysers, Sysmex America). Während der Messungen war die zum Zeitpunkt der Untersuchung aktuelle Software Version 00-13 installiert, die mit veterinärmedizinischen Einstellungen auch speziell für die Katze ausgestattet war.

RET-He gehörte nicht zu einem Standardparameter des automatischen Ergebnisausdruckes des hier verwendeten Sysmex XT-2000iV und hätte als Research-Parameter generiert werden müssen (Literaturübersicht 1.1.2.). Für den Methodenvergleich stellte dieser Parameter keinen Zugewinn dar und in den retrospektiven Daten stand er nicht zur Verfügung, daher ist er kein Bestandteil der Untersuchungen dieser Dissertation. Der Sysmex XT-2000iV war ganztägig in Nutzung und lieferte innerhalb von ungefähr 15 Minuten seine Analysedaten.

#### **4. Statistik**

Für die im Rahmen dieser Dissertation erstellte Statistik, wurde das Statistikprogramm MedCalc® Version 16.8 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) herangezogen.

Für den Methodenvergleich wurden die Ergebnisse des Analysegerätes Sysmex XT-2000iV der manuellen Retikulozytenzählung gegenübergestellt. Die Daten wurden statistisch mit der Passing-Bablok Regression und der Bland-Altman Analyse ausgewertet. Die manuell ausgezählten aggregierten und punktierten Retikulozyten und deren Summe wurden mit der maschinellen Retikulozytenzählung und ihren maschinellen Retikulozytenparametern LFR, MFR, HFR, und IRF verglichen. Jeder dieser Parameter wurde folgendermaßen statistisch evaluiert: Der Y-Achsenabschnitt und die Steigung mit 95 % Konfidenzintervall (CI) wurde von der Passing-Bablok Regression kalkuliert. Eine gute Übereinstimmung des Methodenvergleichs liegt vor, wenn es keine signifikante Abweichung der Steigung von eins sowie keine signifikante Abweichung des Y-Achsenabschnitts von null gibt. Die Steigung dient zur Beurteilung des proportionalen Fehlers, der Y-Achsenabschnitt zur Beurteilung des konstanten Fehlers. Die Bland-Altman Analyse wurde herangezogen, um den Mittelwertunterschied (Bias) mit  $\pm 1,96$  Standardabweichung aufzuzeigen. Das

Bias entspricht der Differenz der Mittelwerte die durch das Analysegerät Sysmex XT-2000iV ermittelt wurden und den Mittelwerten der manuell ausgezählten Werte und weist den systematischen Fehler nach. Da bei der manuellen Auszählung in neun Proben keine Retikulozyten detektiert wurden, konnte in der Bland-Altman Analyse nur das absolute, nicht das relative Bias bestimmt werden.

Die LFR, MFR, HFR und IRF wurden im Ergebnisausdruck des Sysmex XT-2000iV als prozentualer Anteil ihrer Obermenge, der Retikulozytenzahl, angegeben (LFR/MFR/HFR/IRF (%)). Die Retikulozytenzahl wiederum ist als prozentualer Anteil ihrer Obermenge, der Erythrozytenzahl, dargestellt. Dementsprechend wurden die Retikulozytenparameter mit der Retikulozytenzahl normiert, um miteinander statistisch vergleichbar zu sein (LFR/MFR/HFR/IRF in RBC (%)).

Für eine bessere Einschätzung der manuellen aggregierten und punktierten Retikulozyten sollte das in dieser Studie ausgezählte Verhältnis zwischen diesen manuellen Parametern aufgezeigt werden.

In einer Studie wurde eine hohe Zahl von manuell gezählten punktierten Retikulozyten als wahrscheinlicher Grund für einen positiven Bias des Sysmex XT-2000iV gegenüber der manuellen aggregierten Retikulozytenzählung genannt (WEISSENBACHER et al., 2011). Ob diese Hypothese auch auf Basis der Daten der vorliegenden Dissertation statistisch bestätigt werden kann, sollte mittels einer Regressionsgeraden und dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten (Spearmans Rho) aufgezeigt werden. Dieser wird bei Parametern angewandt, die nicht normalverteilt sein müssen. Liegt der Wert bei 0, liegt keine Korrelation vor, +1 steht für eine perfekte positive Korrelation, -1 steht für eine perfekte negative Korrelation. Die Korrelation wurde als „sehr gut“ für  $\rho = 0,93-0,99$ , „gut“ für  $\rho = 0,80-0,92$ , „moderat“ für  $\rho = 0,59-0,79$ , „schwach“ für  $\rho < 0,59$  bewertet (PAPASOULIOTIS et al., 2006).

Für die Evaluation der Retikulozytenwerte des Sysmex im Vergleich zur manuellen Zählung wurde neben dem systematischen Fehler (Bias) auch der zufällige Fehler berechnet. Als Maß für die Präzision wurde der Variationskoeffizient (CV) für Messwiederholungen von 20 nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Doppelmessungen des Sysmex XT-2000iV berechnet. Die

Präzisionsberechnung diente als Maß für die Abweichungen der Retikulozytenwerte und ihrer Parameter. Bei der Durchführung wurde dieselbe Blutprobe unter unveränderten Bedingungen hintereinander von derselben Person am Sysmex XT-2000iV gemessen.

Der Cohen's Kappa Koeffizient ( $\kappa$ ) veranschaulicht die Übereinstimmung der maschinellen und der manuellen Methode im Hinblick auf die diagnostische Aussagekraft über regenerative oder aregenerative Anämie. Hierbei wurde zunächst der auf häufigen Literaturangaben basierende Cut-Off-Wert von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter für die Klassifizierung in regenerative oder aregenerative Anämie verwendet (GIGER, 2000a; TVEDTEN und WEISS, 2000; KOHN, 2001). Anschließend wurde der Cut-Off-Wert für die Aussagekraft des Sysmex XT-2000iV über eine regenerative oder aregenerative Anämie um das zuvor ermittelte Bias angepasst und erneut die Übereinstimmung ermittelt. Die Intensität der Übereinstimmung wurde als „sehr gut“ für  $\kappa = 0,81-1,00$ , „gut“ für  $\kappa = 0,61-0,80$ , „moderat“ für  $\kappa = 0,41-0,60$ , „akzeptabel“ für  $\kappa = 0,21-0,40$ , und „mangelhaft“ für  $\kappa < 0,20$  bewertet (ALTMAN, 1991).

Um die diagnostische Aussagekraft der maschinell ermittelten IRF in Hinblick auf die Einteilung in regenerative und aregenerative Anämie zu beurteilen, wurde für die IRF eine Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) erstellt. Die ROC-Kurve hat sich als gute Basis erwiesen, Cut-Off-Werte und deren diskriminatorische Eigenschaften anzuzeigen (SCHÄFER, 1989). Die Anämieklassifizierung in regenerativ und aregenerativ wurde anhand der manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten mit einem Cut-Off-Wert von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter vorgenommen. Zunächst wurde die ROC Kurve für die allgemein verwendete IRF (%) ermittelt. Wegen der besseren Aussagekraft wird der absolute Retikulozytenwert dem relativen Retikulozytenwert vorgezogen (NEBE et al., 2010). Aus diesem Grund wurde auch die IRF des Sysmex XT-2000iV anhand ihrer relativen Häufigkeit (%) der Gesamtretikulozyten in die jeweilige Absolutzahl ( $10^9/l$ ) umgerechnet, um mithilfe der ROC-Kurven einen möglichen Mehrwert der Absolutzahlen zu evaluieren.

Die retrospektiv gefilterten Laborergebnisse, welche ein physiologisches rotes Blutbild sowie physiologische Thrombozyten- und Leukozytenwerte aufwiesen (Tabelle 1), wurden auf die Wertebereiche der Retikulozyten und ihrer Parameter untersucht. Die Berechnung der nicht-parametrischen Wertebereiche erfolgte



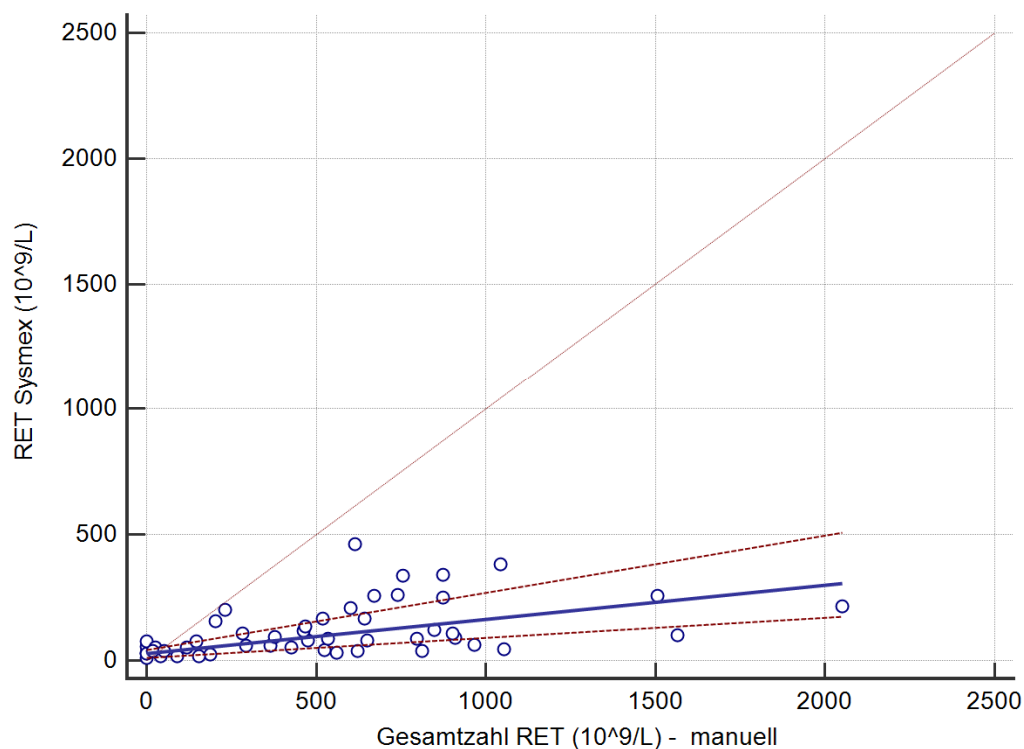
---

gemäß des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3 und wurde als 2,5. und 97,5. Perzentil kalkuliert.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Evaluation der maschinellen im Vergleich mit der manuellen Retikulozytenzählung anämischer Katzen

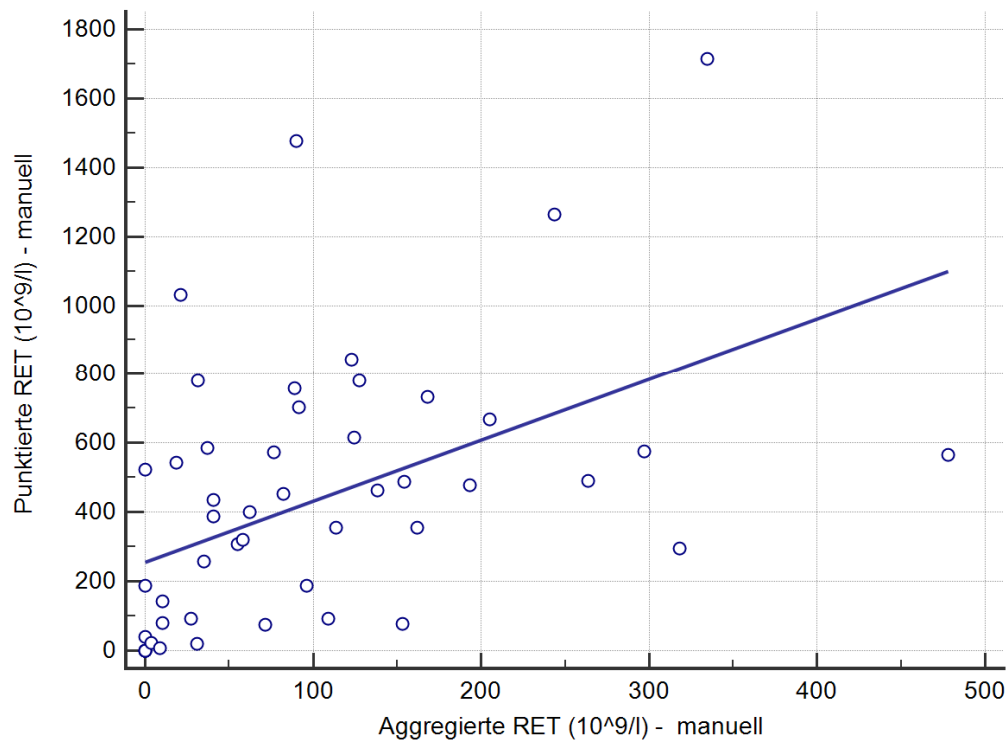
Im ersten Schritt wurde die Gesamtzahl der manuell ausgezählten Retikulozyten mit der maschinell ermittelten absoluten Retikulozytenzahl des Sysmex XT-2000iV verglichen. Bei diesem Vergleich sieht man anhand der Passing-Bablok Regression keine Übereinstimmung (Abbildung 3). Die maschinell ermittelte absolute Retikulozytenzahl wies im Vergleich zu der manuellen Gesamtzahl deutlich niedrigere Werte auf. In der Bland-Altman Analyse ergab sich entsprechend ein hohes Bias von  $-403,788 \times 10^9/l$ .



**Abbildung 3: Passing-Bablok Regression: Vergleich der Retikulozyten (RET) des Sysmex XT-2000iV mit der manuellen Zählung der Gesamtreikulozyten. Die Regressionsgerade wird durch die *solide blaue Linie* repräsentiert und das 95 % CI durch die *gepunkteten roten Linien*.**

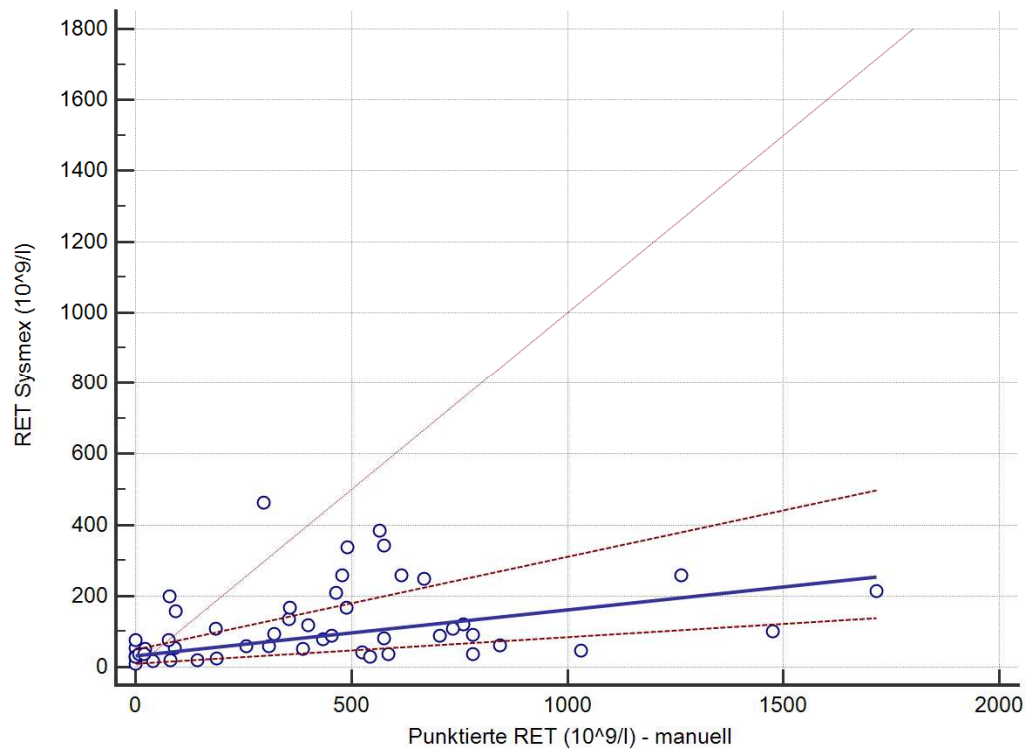
Betrachtet man die Gesamtzahl der manuell ausgezählten Retikulozyten, so setzt sich diese aus den aggregierten und punktierten Retikulozyten zusammen. Die aggregierten Retikulozyten lagen in einem Wertebereich von 0,0 bis  $477,9 \times 10^9/l$ .

Die punktierten Retikulozyten lagen in einem Wertebereich von 0,0 bis  $1716,0 \times 10^9/l$ . Folgendes Streudiagramm zeigt das Verhältnis zwischen den aggregierten und punktierten Retikulozyten der 50 Blutproben anämischen Katzen (Abbildung 4). Im Mittel betrug das Verhältnis der aggregierten Retikulozyten zu den punktierten Retikulozyten 35,42 %.



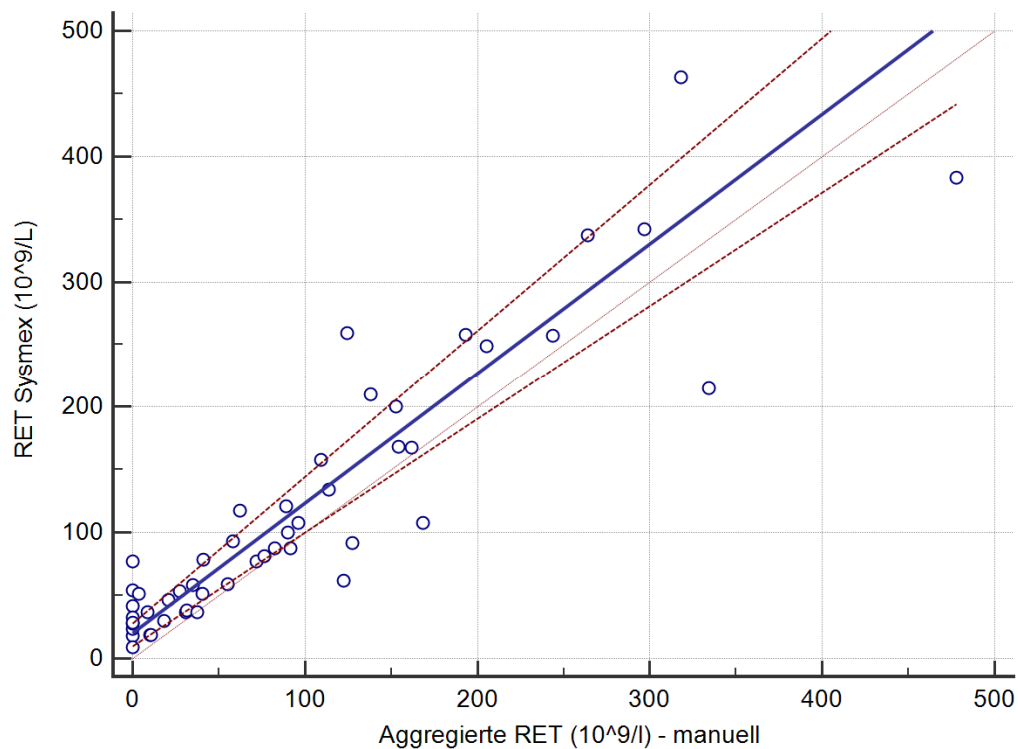
**Abbildung 4: Streudiagramm: Verhältnis der manuell gezählten aggregierten Retikulozyten (RET) zu den manuell gezählten punktierten Retikulozyten.**

Vergleicht man die größere Fraktion der manuell gezählten Retikulozyten, die punktierten Retikulozyten, mit der maschinell ermittelten absoluten Retikulozytenzahl des Sysmex XT-2000iV, dann sind auch hier die maschinell ermittelten Werte deutlich niedriger (Abbildung 5). Somit ergab sich in der Bland-Altman Analyse ein hohes Bias von  $-307,914 \times 10^9/l$ . Dieses hohe Bias war nur geringfügig niedriger als das Bias der Bland-Altman Analyse der manuellen und maschinellen Gesamtreikulozyten.



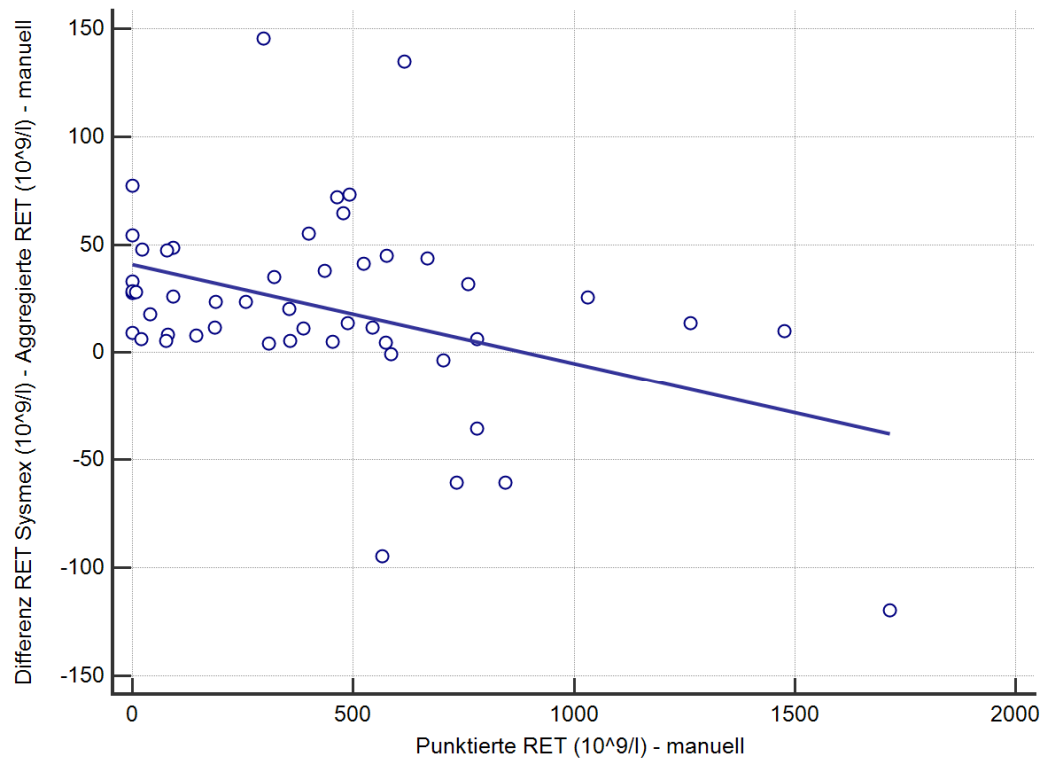
**Abbildung 5: Passing-Bablok Regression: Vergleich der Retikulozyten (RET) des Sysmex XT-2000iV mit der manuellen Zählung der punktierten Retikulozyten. Die Regressionsgerade wird durch die *solide blaue Linie* repräsentiert und das 95 % CI durch die *gepunkteten roten Linien*.**

Erst der Vergleich der manuell gezählten aggregierten Retikulozyten mit der maschinell ermittelten absoluten Retikulozytenzahl des Sysmex XT-2000iV ergab eine gute Übereinstimmung (Abbildung 6). Die Steigung der Regressionsgeraden liegt mit einem Wert von 1,04 fast an dem optimalen Wert von 1, während der Schnittpunkt durch die y-Achse signifikant von dem optimalen Wert 0 abweicht. Somit liegt ein absoluter systematischer Unterschied zwischen den beiden Methoden vor, der sich auch in der Bland-Altman Analyse mit einem Bias von  $+21,45 \times 10^9/l$  bestätigte. Dies bedeutet, trotz der guten Übereinstimmung zwischen den manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten und der maschinellen Retikulozytenzählung, misst der Sysmex XT-2000iV im Mittel um  $21,45 \times 10^9$  höhere Retikulozyten pro Liter.



**Abbildung 6: Passing-Bablok Regression: Vergleich der Retikulozyten (RET) des Sysmex XT-2000iV mit der manuellen Zählung der aggregierten Retikulozyten. Die Regressionsgerade wird durch die *solide blaue Linie* repräsentiert und das 95 % CI durch die *gepunkteten roten Linien*.**

Nach einer Studie von Weissenbacher gibt es Hinweise, dass die höheren Retikulozytenwerte des Sysmex XT-2000iV im Vergleich zu den aggregierten Retikulozytenwerten durch hohe Zahlen von punktierten Retikulozyten hervorgerufen wurden (2011). Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden die Differenzen zwischen den maschinell ermittelten absoluten Retikulozytenzahlen und den manuell gezählten aggregierten Retikulozytenzahlen berechnet und mit der manuellen Zahl der punktierten, der aggregierten und der gesamten Retikulozytenzahl korreliert. In allen drei Fällen ergaben sich negative Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (punktierte Retikulozytenzahl: Spearmans  $\rho = -0,32$  ( $p = 0,024$ ); aggregierte Retikulozytenzahl: Spearmans  $\rho = -0,08$  ( $p = 0,573$ ); gesamte manuelle Retikulozytenzahl: Spearmans  $\rho = -0,28$  ( $p = 0,050$ )). Im Gegensatz zu oben genannter Studie fand sich ein schwach negativer signifikanter Zusammenhang zwischen den punktierten Retikulozyten und dem Grad der höheren Retikulozytenwerte des Sysmex XT-2000iV (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Regressionsgerade: Die Differenzen zwischen den Retikulozyten (RET) des Sysmex XT-2000iV und der manuellen Zählung der aggregierten Retikulozyten wurden mit der manuellen Zählung der punktierten Retikulozyten korreliert.**

Aus der guten Übereinstimmung zwischen den manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten und der maschinellen Retikulozytenzählung war eine Übereinstimmung der manuell ermittelten Retikulozytenwerte mit den maschinellen Retikulozytenparametern IRF, LFR, MFR und HFR nicht zu erwarten. Dies bestätigen die Analyseergebnisse, die in folgender Tabelle aufgezeigt sind (Tabelle 2). Der y-Achsenabschnitt und die Steigung mit dem jeweiligen 95 % CI sind für jeden Retikulozytenparameter aufgelistet.

**Tabelle 2: Ergebnisse der Regressions- und Bland-Altman Analyse – Vergleich der maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik mit der manuellen Retikulozytenzählung.**

Sysmex XT 2000-iV	Manuelle Auszählung	Y-Achsenabschnitt 95 % CI	Steigung 95 % CI	Bias (Bland-Altman) +/- 1,96 SD	p*
RET (10 <sup>9</sup> /l)	Gesamtzahl RET (10 <sup>9</sup> /l)	29,208 10,647 – 42,432	0,135 0,796 – 0,228	-403,788 -1202,749 – 395,173	< 0,001
RET (10 <sup>9</sup> /l)	Aggregierte RET (10 <sup>9</sup> /l)	20,133 9,502 – 27,631	1,035 0,906 – 1,166	21,448 -66,680 – 109,574	0,002
RET (10 <sup>9</sup> /l)	Punktierte RET (10 <sup>9</sup> /l)	30,8345 11,034 – 48,288	0,130 0,074 – 0,262	-307,914 -1031,690 – 415,862	< 0,001
RET (%)	Gesamtzahl RET (%)	0,490 -0,210 – 0,672	0,165 0,106 – 0,288	-11,098 -37,429 – 15,232	< 0,001
RET (%)	Aggregierte RET (%)	0,378 0,288 – 0,548	1,044 0,922 – 1,196	0,406 -2,606 – 3,417	0,068
RET (%)	Punktierte RET (%)	0,545 0,145 – 0,727	0,170 0,114 – 0,336	-8,088 -30,020 – 13,843	< 0,001
IRF in RBC (%)	Gesamtzahl RET (%)	0,027 -0,139 – 0,0594	0,039 0,025 – 0,065	-13,597 -42,514 – 15,319	< 0,001
IRF in RBC (%)	Aggregierte RET (%)	-0,004 -0,059 – 0,029	0,256 0,210 – 0,351	-2,093 -8,276 – 4,090	< 0,001
IRF in RBC (%)	Punktierte RET (%)	0,027 -0,0279 – 0,0752	0,039 0,024 – 0,061	-10,5873 -33,7794 – 12,6047	< 0,001
LFR in RBC (%)	Gesamtzahl RET (%)	0,465 0,261 – 0,723	0,120 0,0737 – 0,188	-12,015 -40,131 – 16,101	< 0,001
LFR in RBC (%)	Aggregierte RET (%)	0,439 0,368 – 0,594	0,749 0,635 – 0,836	-0,511 -5,651 – 4,629	0,174
LFR in RBC (%)	Punktierte RET (%)	0,516 0,352 – 0,771	0,122 0,074 – 0,221	-9,005 -31,828 – 13,818	< 0,001
MFR in RBC (%)	Gesamtzahl RET (%)	0,020 -0,070 – 0,041	0,0271 0,018 – 0,040	-13,873 -43,472 – 15,725	< 0,001
MFR in RBC (%)	Aggregierte RET (%)	0,009 -0,039 – 0,018	0,176 0,151 – 0,229	-2,369 -9,529 – 4,791	< 0,001
MFR in RBC (%)	Punktierte RET (%)	0,034 0,007 – 0,052	0,026 0,018 – 0,041	-10,863 -34,506 – 12,780	< 0,001
HFR in RBC (%)	Gesamtzahl RET (%)	0,006 -0,037 – 0,029	0,009 0,006 – 0,016	-14,240 -44,554 – 16,074	< 0,001
HFR in RBC (%)	Aggregierte RET (%)	-0,003 -0,016 – 0,004	0,069 0,051 – 0,092	-2,736 -10,946 – 5,475	< 0,001
HFR in RBC (%)	Punktierte RET (%)	0,010 -0,012 – 0,034	0,009 0,005 – 0,015	-11,230 -35,355 – 12,896	< 0,001

(\*) Signifikanz des Bias

(†) RET = Retikulozyten; IRF = Immature Retikulozytenfraktion; LFR = Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil; MFR = Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil; HFR = Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil

## 2. Der zufällige Messfehler – die Präzision

Neben dem systematischen Fehler (Bias) einer Messmethode ist der zufällige Fehler (Präzision) für die Wertigkeit einer Messmethode von besonders großer Bedeutung. Von den manuellen Retikulozytenzählungen ist bekannt, dass der zufällige Fehler hoch und damit die Wiederholbarkeit von Messwerten relativ gering ist. Von der automatisierten Messung erhofft man sich hier eine deutliche Verbesserung, die im Folgenden überprüft werden soll. Als Maß für den zufälligen Fehler wurde der CV für Wiederholungsmessungen berechnet.

Die Auswertung von 20 Doppelmessungen zeigte, dass der CV der absoluten Retikulozytenzahl ( $10^9/l$ ) 10,28 % betrug und der CV der relativen Retikulozytenzahl (%) 10,50 %. Eine etwas schlechtere Präzision ergab sich für den Retikulozytenparameter IRF (%), der einen CV von 17,08 % aufwies. Der Wertebereich der Retikulozytenzählungen dieser 20 Proben reichte von  $17,1 \times 10^9/l$  (2,1 %) bis  $152,4 \times 10^9/l$  (25,4 %). Je niedriger die Konzentration der Zellen war, umso höher war der CV (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Präzision der von Sysmex XT-2000iV ermittelten Parameter der Retikulozytenanalytik.**

Retikulozytenparameter	CV (%)	Standardabweichung	Gesamtmittelwert
RET ( $10^9/l$ )	10,28	6,77	65,78
RET (%)	10,50	0,95	9,09
LFR (%)	2,11	1,88	89,40
MFR (%)	20,89	1,73	8,27
HFR (%)	49,40	1,15	2,33
IRF (%)	17,00	1,84	10,76

(\*) CV = Variationskoeffizient

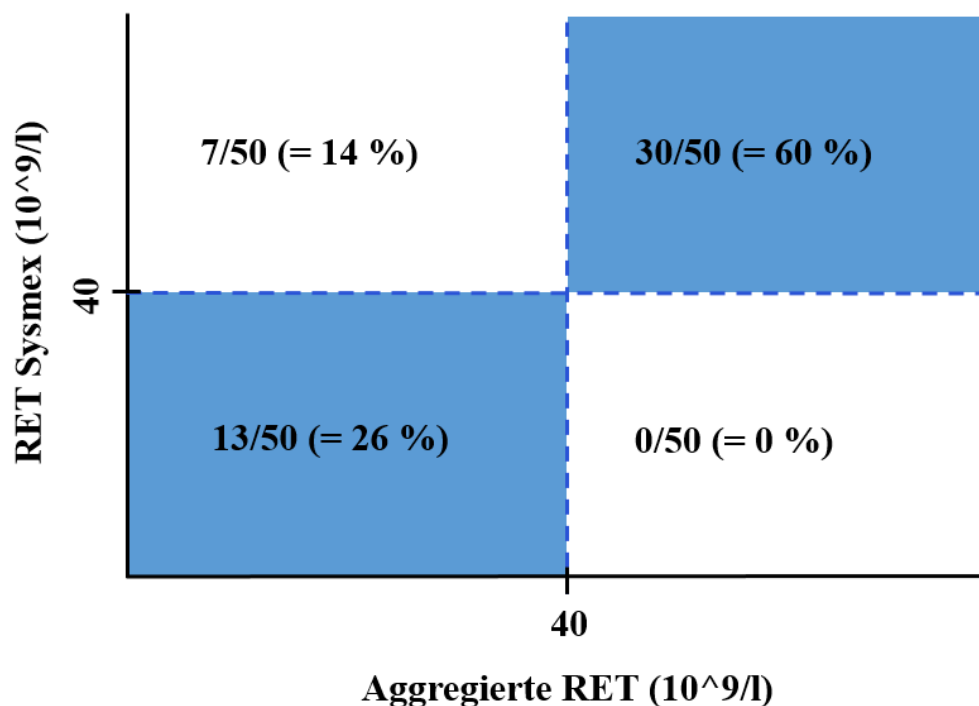
(†) RET = Retikulozyten; LFR = Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil; MFR = Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil; HFR = Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil; IRF = Immature Retikulozytenfraktion.

## 3. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der Retikulozytenzahl

Neben der Vergleichbarkeit zwischen den manuellen und maschinellen Retikulozytenwerten und deren Parameter war aus klinisch diagnostischer Sicht noch wichtiger, ob die aus den Werten resultierenden diagnostischen Aussagen



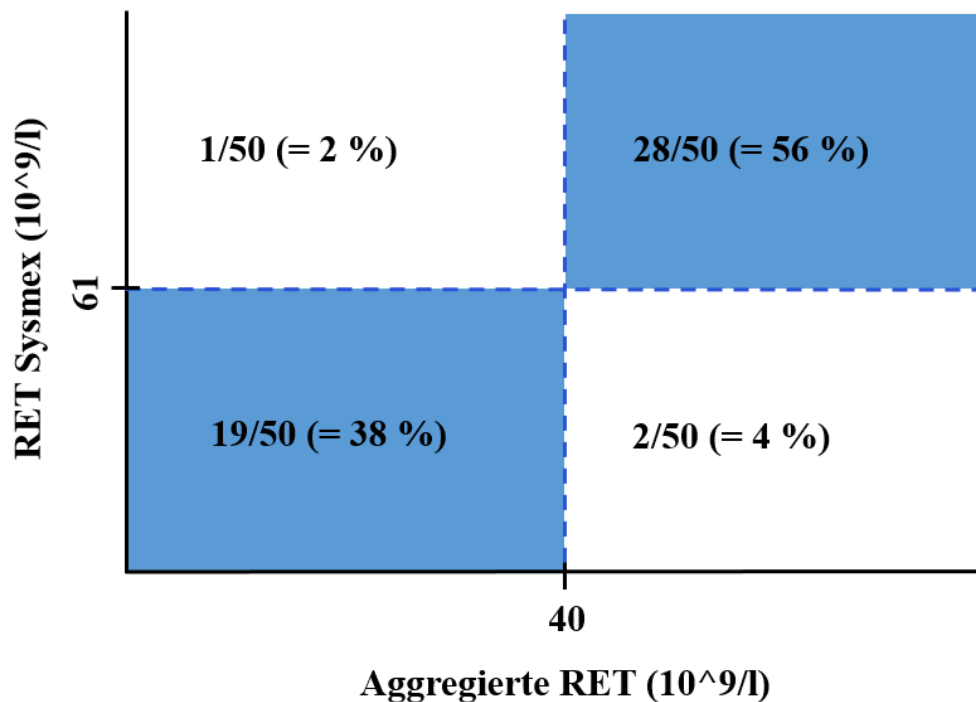
übereinstimmen. Als Maß für die Übereinstimmung der Einteilung in aregenerative oder regenerative Anämie wurde der  $\kappa$  berechnet. Trotz des mit Hilfe der Bland-Altman Analyse ermittelten Bias bei Gegenüberstellung der manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten mit der maschinellen Retikulozytenzählung, zeigte der  $\kappa$  von 0,69 (95 % CI 0,49–0,89) eine gute Übereinstimmung. Bei der Nutzung des Cut-Off-Wertes von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter sowohl für die maschinell als auch für die manuell ermittelte absolute Retikulozytenzählung stimmte der Methodenvergleich zur Bestimmung einer Regeneration in 14 % der Fälle zwischen manueller und maschineller Zählung nicht überein. Diese 14 % der 50 anämischen Katzen waren Proben mit einer höheren maschinellen Retikulozytenzählung (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Vierfelder Kontingenztafel: Die Übereinstimmung (Cohen's Kappa Koeffizient ( $\kappa$ ) = 0,69) der maschinellen Retikulozytenzählung (RET Sysmex) und der manuellen Retikulozytenzählung unter Verwendung eines Cut-Off-Wertes von  $> 40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter für die Regeneration, welcher anhand der blauen Strichlinie dargestellt ist. Das obere linke Feld der Vierfelder Kontingenztafel zeigt die 14 %.**

Es stellte sich die Frage, ob der Cut-Off-Wert des Sysmex XT-2000iV von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter um das Bias von  $+21,45 \times 10^9/l$  korrigiert werden sollte. Werden  $61 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter als Cut-Off-Wert für den Sysmex XT-2000iV verwendet, ergibt sich ein deutlich verbesserter  $\kappa$  von 0,88 (95 % CI 0,74–1,00). Nur noch in 6 % der Fälle stimmte der Methodenvergleich zur

Bestimmung einer Regeneration zwischen manueller und maschineller Zählung nicht überein. Hiervon waren 2 der 50 anämischen Katzenproben mit einer höheren manuellen aggregierten Retikulozytenzählung gemessen worden sowie 1 der 50 anämischen Katzen mit einer höheren maschinellen Retikulozytenzählung (Abbildung 9).

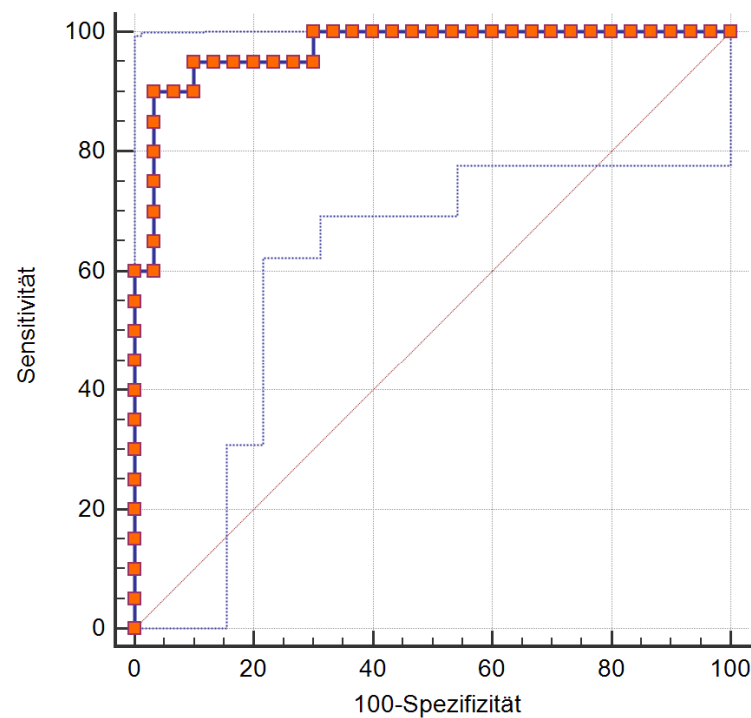


**Abbildung 9: Vierfelder Kontingenztafel: Die Übereinstimmung (Cohen's Kappa Koeffizient ( $\kappa$ ) = 0,88) der maschinellen Retikulozytenzählung (RET Sysmex) und der manuellen aggregierten Retikulozytenzählung unter Verwendung eines Cut-Off-Wertes von  $> 40 \times 10^9$  aggregierter Retikulozyten pro Liter sowie eines angepassten Cut-Off-Wertes von  $> 61 \times 10^9$  maschinell ermittelten Retikulozyten pro Liter für die Regeneration. Die zwei Cut-Off-Werte sind anhand der *blauen Strichlinie* dargestellt.**

#### 4. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der IRF

In der Humanmedizin hat sich von den Retikulozytenparametern des Sysmex XT-2000i insbesondere die IRF als diagnostisch wertvoll erwiesen (Literaturübersicht 1.1.3.). Es sollte daher im Folgenden mit Hilfe einer ROC-Kurve ermittelt werden, ob die IRF auch bei Katzen zur Differenzierung von aregenerativen und regenerativen Anämien geeignet sei. Das Analysegerät Sysmex XT-2000iV gab die Werte der IRF als relative Häufigkeiten in Prozent der Gesamtretikulozytenzahl an. Die ROC-Kurve für diese relativen Werte der IRF ergab einen Cut-Off-Wert von 13,7 % bei einer Sensitivität von 85,0 % und einer

Spezivität von 76,7 %. Wird die Sensitivität für die Erkennung einer aregenerativen Anämie auf 95,0 % hochgesetzt, so betrug der Cut-Off-Wert  $< 23,9$  % bei einer deutlich gesunkenen Spezifität von 43,3 %. Wurden die absoluten Werte der IRF eingesetzt, erhielt man deutlich bessere Sensitivitäten und Spezifitäten. Die ROC-Analyse ergab einen Cut-Off-Wert von  $5,69 \times 10^9/l$  bei sehr hohen Sensitivitäten und Spezifitäten von 90,0 % und 96,7 % (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurve: Bestimmung eines optimalen Cut-Off-Wertes für die Immature Retikulozytenfraktion (IRF ( $10^9/l$ )) um eine Anämie in regenerativ oder aregenerativ zu klassifizieren (n = 50).**

## 5. Wertebereiche von Parametern der Retikulozytenanalytik

In einem zusätzlichen retrospektiven Teil wurden die Retikulozytenwerte mit Fokus auf nicht anämische Katzen untersucht. Nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien und dem Filtern der Daten mithilfe des Statistikprogramms Statistical Package for Social Science, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) konnten 7,51 % (165/2197) der Blutproben der Klinikpopulation herausausgefiltert werden, deren Erythrozytenzahl, Erythrozytenparameter, Leukozytenzahl sowie Thrombozytenzahl sich innerhalb der von der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

festgelegten Referenzbereiche befanden. Anhand dieser 165 Proben wurden Wertebereiche für die Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV bestimmt (Tabelle 5).

**Tabelle 4: Wertebereiche für die Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV von nicht anämischen Katzen (n = 165).**

Retikulozyten-parameter	Mittelwert	Median	Standardabweichung	Minimum-Maximum	2,5.-97,5. Perzentil
RET ( $10^9/l$ )	61,35	54,60	28,26	18,40-152,50	22,51-141,80
RET (%)	7,04	6,40	3,23	2,30-17,50	02,53-16,01
LFR ( $10^9/l$ )	56,50	51,07	24,99	18,05-138,71	21,44-124,61
LFR (%)	92,80	93,60	4,65	72,40-100,00	80,03-100,00
MFR ( $10^9/l$ )	3,87	3,08	3,88	0,00-30,96	0,00-15,31
MFR (%)	5,79	5,09	3,58	0,00-20,60	0,00-13,80
HFR ( $10^9/l$ )	0,98	0,44	1,43	0,00-10,98	0,00-5,38
HFR (%)	1,41	0,90	1,50	0,00-7,20	0,00-5,06
IRF ( $10^9/l$ )	4,85	3,73	5,13	0,00-42,09	0,00-22,03
IRF (%)	7,20	6,40	4,65	0,00-27,60	0,00-19,98

(\*) RET = Retikulozyten; LFR = Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil; MFR = Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil; HFR = Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil; IRF = Immature Retikulozytenfraktion.

## 6. Retikulozytose bei nicht anämischen Katzen

Von diesen 165 Proben, die keine Anämie aufwiesen und auch eine physiologische Leukozyten- und Thrombozytenzahl zeigten, hatten 42,42 % (70/165) eine Retikulozytose mit über  $60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter. Dieser Cut-Off Wert entspricht dem Ergebnis des Methodenvergleichs ( $61 \times 10^9$ ), der für eine bessere klinische Anwendbarkeit gerundet wurde. Die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie bezogen auf die Gesamtprobenanzahl betrug 3,19 % (70/2197). Diese nicht anämischen Katzen mit einer Retikulozytose wurden auf Basis der klinischen Historie in der Datenbank nach Vorstellungsgrund und vorliegenden Erkrankungen eingeteilt. In folgender Tabelle steht hinter der Anzahl der Erkrankungen jeweils in Klammern die anteilige Menge, die von multimorbiden Patienten stammt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Retrospektiv erfasste Erkrankungen von Katzen, die eine Retikulozytose aufwiesen ohne Anämie (n = 70) mit Mehrfachnennungen (n = 86).**

Krankheitsklassifizierung / Diagnosen	Anzahl (davon x multimorbide Katzen)	Vor-/Behandlung mit NSAIDs, Glukokortikoiden, Chemotherapeutika, Bestrahlung  Krankheitsverlauf
<b>Neoplastische Erkrankungen (Klasse 1)</b>	<b>14/86 (= 16,3 %)</b> davon drei Mehrfachnennungen	
• Adenokarzinom der Mammaleiste	1	
• Fibrosarkom	1 1 1 (1) 2 1 1 (1)	Operabel Operabel Tumorrezidiv 6 Monate post Fibrosarkom, Prä Bestrahlung Post OP, Prä Bestrahlung Prä Bestrahlung Inoperabel (Palladia-Studie)
• Intranasales Lymphom	1	Post Bestrahlung/ Beginn der Chemotherapie
• Mastzelltumor	2 (1)	
• Malignes Leberkarzinom	1	
• Plattenepithelkarzinom	2	
<b>Neoplastische versus inflammatorische Erkrankungen (Klasse 2)</b>	<b>9/86 (= 10,5 %)</b> davon eine Mehrfachnennung	
• Chronisch katarrhalisch eitrige Rhinitis (mit blutigem Nasenausfluss)	1	Mit Glukokortikoiden und NSAIDs vorbehandelt
• Chylothorax mit präkardialer Masse/ Chyloabdomen mit Masse der Milz	2	
• Hautknoten mit detritischen Zellen	1	
• Intrakraniell	2 (1)	Start mit Prednisolon (Zwei Monate später eingeschlafert)
• V.a. intestinales Lymphom	1	Vorbehandelt mit Methylprednisolon-Acetate, Beginn mit Chlorambucil
• Retropharyngeale Masse/Massen um Larynx, Pharynx	2	Start mit Prednisolon
<b>Endokrine Erkrankungen (Klasse 3)</b>	<b>9/86 (= 10,5 %)</b> davon sieben Mehrfachnennungen	
• Diabetes mellitus (iatrogen post Methylprednisolonacetat-Gabe wegen des Asthmas)	3 (2)	
• Diabetische Ketoazidose	1	

• Hyperthyreose	5 (5)	
<b>Dermatologische Erkrankungen (Klasse 4)</b>	<b>8/86 (= 9,3 %)</b> davon vier Mehrfachnennungen	
• V.a. eosinophiles Granulom (blutend)	1	
• Hautläsion und Ulcera am harten Gaumen	1	
• Miliare Dermatitis / Pyodermie	1	
• Ölige Seborrhoe mit Exkoration	1 (1)	
• Stomatitis / Faucitis / Gingivitis	4 (3)	Robenacoxib, Meloxicam
<b>Kardiologische / respiratorische Erkrankungen (Klasse 5)</b>	<b>8/86 (= 9,3 %)</b> davon vier Mehrfachnennungen	
• Bordetellen-Mykoplasmen Bronchiopneumonie	1	Vier Jahre später wegen FIP eingeschläfert
• HCM/ V.a. HCM	2 (2)	
• Kardiomyopathie mit Arrhythmie und Lungenödem	1	
• Kardiales Lungenödem (Unklassifizierte Kardiomyopathie)	1 (1)	
• Mitralklappeninsuffizienz	1 (1)	
• Pneumothorax	1	
• Rauchvergiftung	1	
<b>Urologische Erkrankungen (Klasse 6)</b>	<b>7/86 (= 8,1 %)</b> davon vier Mehrfachnennungen	
• Chronische Niereninsuffizienz	3 (3)	
• Urolithiasis	2	Meloxicam
• Zystitis	2 (1)	Meloxicam
<b>Traumata (Klasse 7)</b>	<b>5/86 (= 5,8 %)</b>	
• V.a. Biss / Trauma	1	
• Fraktur des Metacarpus	1	
• Grashalm	1	Von Haustierarzt vorbehandelt, Meloxicam
• Rissverletzung	1	
• Reposition der frakturierten Pars incisiva	1	Meloxicam
<b>Gastrointestinale Erkrankungen (Klasse 8)</b>	<b>5/86 (= 5,8 %)</b> davon zwei Mehrfachnennungen	
• Chronische Diarrhoe	1 (1)	
• Fibrosierende Gastritis	1	
• Inflammatory Bowel Disease	1 (1)	
• Koprostase mit V.a. Beckeneinengung / mit V. a. L6-Nervenwurzelkompression	2	Von Haustierarzt vorbehandelt (NSAIDs?)
<b>Neurologische Erkrankungen (Klasse 9)</b>	<b>4/86 (= 4,7 %)</b> davon eine Mehrfachnennung	

• Epilepsie	4 (1)	Meloxicam
<b>Hepatopathien (Klasse 10)</b>	<b>3/86 (= 3,5 %)</b> davon eine Mehrfachnennung	
• Chronische Cholangiohepatitis	1	
• Chronische Hepatopathie	1 (1)	
• Hepatolipidose	1	
<b>Gynäkologische Komplikationen (Klasse 11)</b>	<b>2/86 (= 2,3 %)</b>	
• Geburt von 7 Welpen, davon 2 Totgeburten mit V.a. intrauterine Infektion	1	
• Prä Kaiserschnitt	1	
<b>Orthopädische Erkrankungen (Klasse 12)</b>	<b>1/86 (= 1,2 %)</b> davon eine Mehrfachnennung	
• Coxarthrose	1 (1)	Seit 14 Tagen Meloxicam
<b>Sonstige Erkrankungen</b>	<b>4/86 (= 4,7 %)</b> davon eine Mehrfachnennung	
• Angiomatose	1	
• Chronisch krank / Seitenlage	1	
• Idiopathische Hypertension mit Hyphaema	1 (1)	
• Mucopolysaccharidose	1	
<b>Keine Erkrankungen</b>	<b>7/86 (= 8,1 %)</b>	
• Blutspende	1	Letzte Blutspende vor acht Monaten
• Prä Blutspende	1	Zwei Jahre später: intestinales Lymphom
• Kastration und Chip	1	
• Kein Befund	1	
• Gesundheitscheck	1	Ein Jahr später: Pemphigus foliaceus, Drei Jahre später: präkardiale Masse und Euthanasie
• Zahnsanierung (ggr.-mgr. Zahnstein)	1	
• Zuchtuntersuchung	1	

(\*) 11 Doppelnennungen, eine Dreifachnennung und eine Vierfachnennung aufgrund der Multimorbidität von 13 Katzenpatienten.

## **V. DISKUSSION**

Die vorliegende Dissertation beurteilte die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV. Hierfür waren sowohl der grundlegende Methodenvergleich zwischen manueller und maschineller Retikulozytenzählung anämischer Katzen von Bedeutung, als auch die Beurteilung der Parameter der Retikulozytenanalytik bei nicht anämischen Katzen und deren mögliche Ätiopathogenesen für eine Retikulozytose.

### **1. Evaluation der maschinellen im Vergleich mit der manuellen Retikulozytenzählung anämischer Katzen**

Im Zeitraum von Januar 2013 bis März 2014 wurden Blutproben 50 anämischer Katzen für den Methodenvergleich zwischen maschineller und manueller Retikulozytenzählung mitsamt ihren jeweiligen Unterfraktionen untersucht.

Die beste Übereinstimmung erzielte der Vergleich zwischen der maschinellen Retikulozytenzählung und der manuellen Auszählung von aggregierten Retikulozyten. Die manuell ermittelten Retikulozytenwerte zeigen keine Übereinstimmung mit den maschinellen Retikulozytenparametern LFR, MFR, HFR und IRF bei anämischen Katzen (Tabelle 2). Folglich ist die maschinell ermittelte Gesamtretikulozytenzahl momentan der am besten mit der manuellen aggregierten Retikulozytenzählung in Übereinstimmung zu bringende Parameter, um die aktuelle Knochenmarkantwort aufzuzeigen. Denn der Auswurf junger Erythrozyten spiegelt sich in der aggregierten Retikulozytenzahl wider. Abgesehen von einer gewissen Überschätzung entspricht der Retikulozytenwert des Sysmex XT-2000iV der Anzahl aggregierter Retikulozyten ( $\text{Bias} = + 21,4 \times 10^9/\text{l}$ ). Der positive Mittelwertunterschied zwischen maschineller Retikulozytenzählung und der manuellen Auszählung aggregierter Retikulozyten unterstreicht die Ergebnisse früherer Studien. Die drei Studien, die sich mit dem Vergleich zwischen Sysmex XT-2000iV und der manuellen Retikulozytenauszählung aggregierter Retikulozyten von Katzen beschäftigten, waren jedoch nicht auf Anämie fokussiert und hatten gewisse Limitationen. In der ersten Studie war der Stichprobenumfang gering und es wurde nicht angegeben, ob die Katzen anämisch waren. Es wurde beschrieben, dass lediglich fünf Proben eine deutliche Retikulozytose aufwiesen. Die maschinelle Retikulozytenzählung (%) hatte ein



positives Bias von 6 % gegenüber der manuellen aggregierten Retikulozytenzählung (%) (LILLIEHOOK und TVEDTEN, 2009). Die Patientenproben, die in der zweiten Studie Verwendung fanden, hatten größtenteils einen normalen HCT. Da die Studie nicht auf anämische Katzen bezogen war, gibt es Limitationen in der Evaluierung des Methodenvergleichs. Der Methodenvergleich ist hinsichtlich der niedrigeren und konstanteren Retikulozytenzahlen gesunder Patienten im Vergleich zu anämischen Katzen eingeschränkt. Der Verlauf einer Anämie ist dynamisch, weshalb das Blutbild variieren kann (PALTRINIERI, 2014). Die zweite Studie ermittelte ein positives Bias der maschinellen Retikulozytenzählung von 0,66 % mit einem proportionalen Fehler (BAUER et al., 2012). Die dritte Studie untersuchte aussagekräftige Daten mit hohen und niedrigen Retikulozytenwerten, aber wiederum wurde kein Fokus auf anämische Katzen gelegt. Das positive Bias der maschinellen Retikulozytenzählung betrug  $50,2932 \times 10^9/l$ , beziehungsweise 1,08 %. Des Weiteren zeigte die maschinelle Methode in 28 Fällen eine Retikulozytose auf, in denen die manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten nicht erhöht waren. Diese Diskrepanz konnte am wahrscheinlichsten auf eine hohe Anzahl punktierter Retikulozyten zurückgeführt werden. Zunächst wurden jedoch die punktierten Retikulozyten nicht manuell ausgezählt, sondern erst während der Suche nach einer Erklärung für die Diskrepanz wurde lediglich in diesen 28 Fällen die hohe Anzahl der punktierten Retikulozyten entdeckt und ausgezählt. Hinsichtlich des möglichen Einflusses punktierter Retikulozyten weist diese dritte Studie somit Limitationen der Methodvalidierung auf (WEISSENBACHER et al., 2011). In der vorliegenden Dissertation konnte hingegen ein schwach negativer signifikanter Zusammenhang zwischen den punktierten Retikulozyten und dem Grad der höheren Retikulozytenwerte des Sysmex XT-2000iV gefunden werden (Abbildung 7). Der positive Mittelwertunterschied zwischen der maschinellen Zählung und der manuellen Zählung der aggregierten Retikulozyten, der anhand des Einflusses punktierter Retikulozyten erklärt wurde, war wahrscheinlich multifaktoriell. Betrachtet man den RNA Gehalt, sollten die punktierten Retikulozyten die größte Auswirkung auf die LFR haben, was in dieser Dissertation nicht nachgewiesen werden konnte. Sehr wahrscheinlich misst der Sysmex XT-2000iV nur punktierte Retikulozyten mit der höchst möglichen Anzahl an punktförmiger RNA, die grenzwertig noch nicht als aggregierte Retikulozyten gelten. Falls diese jungen punktierten Retikulozyten für den positiven Mittelwertunterschied mitverant-

wortlich sind, hängt dies von dem frühen Reifungsstadium ab und nicht zwangsläufig von der Anzahl der punktierten Retikulozyten. Desweiteren existiert bisher bei Katzen weder für die maschinelle (Kapitel V.5.) noch für die manuelle Retikulozytenzählung eine standardisierte Definition für eine einheitliche Erfassung der Retikulozyten und ihrer Parameter. Es gibt keine einheitlichen Richtlinien für die manuelle Retikulozytenzählung. Für die Differenzierung zwischen punktierten und aggregierten Retikulozyten definieren einige Autoren beispielsweise die aggregierten Retikulozyten als Zellen mit großen RNA-Strängen oder RNA-Knäueln (PERKINS et al., 1995; WEISSENBACHER et al., 2011). Andere Autoren definieren diese als Zellen, die eine oder mehrere aggregierte ribosomale RNA oder eine bestimmte Anzahl von Punkten enthalten. Abbott und McGrath (1991) grenzen z. B. aggregierte Retikulozyten als Zellen mit mehr als 6 Punkten ein, wohingegen Lilliehook und Tvedten (2009) die Grenze bei über 15 Punkten zogen.

## **2. Der zufällige Messfehler – die Präzision**

Neben dem systematischen Fehler wurde der zufällige Fehler des Sysmex XT-2000iV untersucht, um die Aussagekraft der Messmethode einordnen zu können. Die Präzision der maschinellen Retikulozytenzählung und ihrer Parameter ist moderat bis schlecht. Der CV für die absolute Retikulozytenzählung betrug bei den 20 Doppelmessungen 10,28 % und für die relative Retikulozytenzählung 10,50 %. Die Messungen der Retikulozytenparameter weisen deutliche Unterschiede in ihrer Reproduzierbarkeit auf. Die LFR wies eine sehr gute Präzision (2,11 %) auf. Dagegen waren die Präzision der MFR und HFR mit Werten zwischen 20,89 % und 49,40 % ungenügend. Der Cut-Off-Wert der HFR, MFR und LFR basiert zum Teil auf flexiblen Diskriminatoren und Algorithmen, die in dem japanischen Mutterunternehmen von Sysmex entwickelt wurden. Die IRF, die sich aus der Summe der MFR und HFR ermittelt, hat dagegen eine bessere Präzision (17,00 %) als ihre Untereinheiten jeweils einzeln. Dies könnte darin begründet sein, dass der Sysmex XT-2000iV Schwierigkeiten hat, reproduzierbar und präzise die kleine Zellzahl der MFR und HFR voneinander zu unterscheiden, was zu dem ungenügenden CV führte. Folglich ist die Präzision der MFR und HFR nicht so gut wie die Präzision der IRF. Die von dem Sysmex XT-2000iV berechnete IRF ist präziser, da die MFR und HFR nicht wiederholbar ihren diskreten Grenzen zugeteilt werden müssen. Dieses Problem

wird intensiviert, falls die Zellzahl der Retikulozyten im Vergleich zu anderen Zelllinien relativ gering ist. Je niedriger die Messgröße und der Messbereich sind, umso schlechter ist die Präzision. Diese scheinbar schlechte Präzision ist ein typisches Phänomen bei sehr kleinen Werten ohne entsprechend hohe Messgenauigkeit. Trotz absolut geringer Abweichungen hat man relativ sehr hohe Abweichungen und damit einen hohen CV. Die Ergebnisse der Präzision sind mit denen aus der Literatur vergleichbar (BLAHA-KAPLANS, 2013). Um eine bessere Präzision der Retikulozytenparameter bei Katzen zu erhalten, wäre es empfehlenswert diese mehrfach zu messen. Besonderes Augenmerk sollte zudem auf Patienten gerichtet werden, bei denen andere Zellen wie Leukozyten, Thrombozytenaggregate oder Zellen mit zytoplasmatischen Einschlüssen vermehrt auftreten, denn die kleine Zellpopulation, die in die IRF einfließt, kann aufgrund solcher Zellen fehleranfällig sein (VILLAMOR et al., 1996; HUH et al., 2007).

Trotz dieser Ergebnisse ist das Analysegerät Sysmex XT-2000iV präziser als die manuelle Retikulozytenzählung, denn die Präzision ist abhängig von der Anzahl der Zellen, die ausgezählt werden und die komplexe Morphologie der feline Retikulozyten stellt insbesondere in der manuellen Auszählung eine Herausforderung dar. Im Gegensatz zu der manuellen Zählung misst das Analysegerät Sysmex XT-2000iV Zehntausende von Zellen (Kapitel III.3.), was in Anbetracht der 20 Doppelmessungen mit einem CV von 10,28 % zu einer höheren Präzision der Retikulozytenwerte führt. Der inter- und intraobserver CV manueller Retikulozytenzählungen ist bekanntermaßen hoch. Der Wert reicht von 12,5 % bei hohen Retikulozytenzahlen bis 65,6 % bei niedrigen Retikulozytenzahlen in einer älteren Studie und von 31,4 % bei hohen Retikulozytenzahlen bis 36,7 % bei niedrigen Retikulozytenzahlen in einer aktuelleren Studie (BUTTARELLO et al., 1996; WEISSENBACHER et al., 2011). Dieser hohe CV lässt sich anhand einer fehlerhaften Interpretation der Retikulozytenmorphologie erklären oder auf reife Retikulozyten zurückführen, die wegen ihres geringen RNA-Gehaltes in der manuellen Zählung nicht entdeckt werden konnten. In der vorliegenden Dissertation zählte ausschließlich eine Person jeweils 1000 Zellen, daher existiert keine interobserver Variabilität.

### **3. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der Retikulozytenzahl**

Nachdem der Vergleich zwischen der absoluten Retikulozytenzahl des Sysmex und der manuellen Auszählung von aggregierten Retikulozyten die beste Übereinstimmung aufwies, wurde untersucht wie diese zwei Methoden hinsichtlich der klinisch relevanten Klassifizierung in regenerative und aregenerative Anämie übereinstimmen. Verwendet man einen Cut-Off-Wert von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter um die Anämie in regenerativ oder aregenerativ zu klassifizieren, zeigte der  $\kappa$  von 0,69 eine gute Übereinstimmung zwischen der maschinellen Retikulozytenzählung und den manuell ausgezählten aggregierten Retikulozyten, trotz des positiven Bias. Ein klinisch relevanter Unterschied zwischen beiden Methoden der Anämieklassifizierung wurde nur in 14 % der Fälle festgestellt (Abbildung 8), wohingegen Weissenbacher et al. (2011) diesen in 28 % der Fälle auswertete. Jedoch verwendete letztgenannte Studie für die maschinelle und manuelle Auszählung einen Cut-Off-Wert von  $60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter und eine andere Definition aggregierter Retikulozyten (WEISSENBACHER et al., 2011). Korrigierte man den Cut-Off-Wert für die maschinelle Retikulozytenzählung von  $40 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter um den Mittelwertunterschied von  $21 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter nach oben, ergab sich ein deutlich verbesserter  $\kappa$  von 0,88 (95 % CI 0,74–1,00) (Abbildung 9). Nur noch in 3 Fällen (6 %) stimmte der Methodenvergleich zur Anämieklassifizierung zwischen manueller und maschineller Zählung nicht überein.

### **4. Evaluation der Anämieklassifizierung auf Basis der IRF**

In der Humanmedizin ist die IRF der früheste Parameter um eine Knochenmarkantwort aufzuzeigen (Literaturübersicht 1.1.3.). Als Grundlage für den Nutzen der IRF bei anämischen Katzen wurde anhand von ROC-Kurven untersucht, wie hoch die Sensitivität und Spezifität der IRF ist, um eine Anämie zu klassifizieren. Betrachtet man die ROC-Kurven, weist die IRF (%) bei einem Cut-Off-Wert von 13,7 % die beste Sensitivität (85,0 %) und Spezifität (76,7 %) auf, um eine regenerative Anämie und eine aregenerative Anämie zu differenzieren. Dieser Cut-Off-Wert ähnelt dem oberen Bereich des in der Humanmedizin ermittelten Referenzintervalls. Wie bereits in der Literaturübersicht unter 1.1.3. erwähnt, lag das Referenzintervall der IRF in einer

humanmedizinischen Studie bei den 422 von Sysmex XT-2000i analysierten Blutproben bei 0,7-11,6 % (BLAHA-KAPLANS, 2013). Selbst in der Humanmedizin sind gerätespezifische Referenzintervalle in der Literatur nur wenig vertreten, obwohl die Retikulozytenzahlen und deren Parameter der verschiedenen Hämatologie-Analysegeräte signifikant voneinander abweichen (NEBE et al., 2011; BLAHA-KAPLANS, 2013). Die nach Wissen der Autorin einzige Studie, die mit dem Sysmex XT-2000iV Referenzwerte für Katzen erstellte, ermittelte für die IRF ein Referenzintervall von 0,7 % bis 18,7 % (GRANAT et al., 2014).

Wurden die absoluten Werte der IRF verwendet, so erhielt man bei einem Cut-Off-Wert von  $5,69 \times 10^9/l$  höhere Sensitivitäten und Spezifitäten von 90,0 % und 96,7 % (Abbildung 9). Die Ergebnisse dieser ROC-Kurven werfen die Frage auf, ob nicht nur die Retikulozytenwerte, sondern auch deren Retikulozytenparameter in ihre Absolutzahlen umgerechnet werden sollten. Bisher wird die IRF gemäß eines Workshops, welcher von der International Society for Laboratory Hematology (ISLH) gesponsert wurde, vorzugsweise als Fraktion der Retikulozyten (Wertebereich 0,00-1,00) angegeben (DAVIS, 1997; BRIGGS et al., 2001). Das Analysegerät Sysmex gibt die Retikulozytenparameter LFR, MFR, HFR und IRF ebenfalls als Prozentwerte der absoluten Retikulozytenzahl an (Wertebereich 0 %-100 %) (BRIGGS et al., 2001). Die Verwendung absoluter Werte der IRF wäre eine Alternative zu Davis und Buttarellos Vorschlag, die IRF (%) der absoluten Retikulozytenzahl gegenüberzustellen, um die Anämien anhand ihrer möglichen Knochenmarkantwort besser einstufen zu können (DAVIS, 1996; BUTTARELLO et al., 2002). Die absolute Retikulozytenzahl hat sich gegenüber der relativen Retikulozytenzahl aufgrund der besseren klinischen Aussagekraft bereits durchgesetzt. Denn die absolute Retikulozytenzahl ist ein Maß für die effektive Erythrozytenproduktion. Dies gilt nicht nur für den Zustand einer gleichbleibenden, sondern auch für eine verminderte oder erhöhte Erythrozytenproduktion (PIERRE, 2002; NEBE et al., 2010). Führt man dies weiter aus, könnten die absoluten Werte der IRF bei Katzen ein noch früheres Maß für eine effektive Retikulozytenproduktion darstellen. Dies könnte nicht nur für den Zustand einer stabilen Retikulozytenproduktion gelten, bei der die IRF und die absolute Retikulozytenzahl korrelieren, sondern auch für einen Zustand mit verminderter oder erhöhter Retikulozytenproduktion. Bei Verwendung der absoluten IRF könnten dabei aktuellere Aussagen unabhängig der bereits

vorliegenden Konzentration der reiferen und sich länger im Blut befindlichen Retikulozyten (LFR) getroffen werden. Neben den besseren Ergebnissen dieser Doktorarbeit bezüglich der Anämie-Klassifizierung auf Basis absoluter Cut-Off-Werte könnte die absolute IRF somit konstantere Aussagen unabhängig der Phase der Erythropoese treffen.

Die hohen Sensitivitäten und Spezifitäten der IRF bei der Anämiklassifizierung innerhalb dieser Dissertation könnten darin begründet sein, dass die Anämie-einteilung auf Basis der aggregierten Retikulozyten vorgenommen wurde. Diese beiden Unterfraktionen spiegeln bei der Katze, trotz des hohen negativen Bias der IRF gegenüber der aggregierten Retikulozytenzahl (Tabelle 2), die jüngeren Retikulozyten wider.

## **5. Wertebereiche von Parametern der Retikulozytenanalytik**

Retrospektiv wurden in einem Zeitraum von August 2011 bis August 2013 die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV untersucht. Ziel war es herauszufinden, wie sich die Wertebereiche einer diffusen, hauptsächlich kranken, feline Klinikpopulation verhielten, deren Erythrozytenzahl, Erythrozytenparameter, Leukozytenzahl sowie Thrombozytenzahl sich innerhalb der von der Medizinischen Kleintierklinik festgelegten Referenzbereiche befanden. Betrachtet man die retrospektiv kalkulierten gerätespezifischen Wertebereiche der vorgestellten 165 Katzen, so fallen auch bei diesen nicht anämischen Katzen erhöhte Retikulozytenwerte auf, die von dem Sysmex XT-2000iV analysiert wurden. Warum auch nicht anämische und als gesund befundene Katzen eine Retikulozytose aufweisen können, wird weiter unten (Kapitel V.6.) ausführlich diskutiert.

Im Folgenden werden die Literaturangaben der Referenzintervalle verschiedener Hämatologie-Analysegeräte für feline Retikulozyten und deren Parameter von gesunden Katzen den ermittelten Wertebereichen der in dieser Doktorarbeit verwendeten Daten der nicht anämischen Klinikpopulation gegenübergestellt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Gegenüberstellung der Parameter der Retikulozytenanalytik (2,5.-97,5. Perzentil) anhand Literaturangaben von Referenzintervallen gesunder Katzen versus der in dieser Studie ermittelten Wertebereiche einer nicht anämischen Klinikpopulation.**

<b>Retikulo- zyten- parameter</b>	<b>Moritz 2004 ADVIA 120  n = 61</b>	<b>Weissert 2011 ADVIA 120  n = 44</b>	<b>Granat 2014 ProCytex DX  n = 81</b>	<b>Granat 2014 Sysmex XT-2000iV  n = 81</b>	<b>diese Studie Sysmex XT-2000iV  n = 165</b>
RET (10 <sup>9</sup> /l)	3,66-94,06	7,12-69,06	3,8-48,6	19,1-107,1	22,51-141,80
RET (%)	0,05-1,17	0,08-0,80	0,0-0,5	0,2-1,1	0,25-1,60
LFR (%)	-	-	-	81,3–99,3	80,03-100,00
MFR (%)	-	-	-	0,0-13,8	0,00-13,80
HFR (%)	-	-	-	0,0-5,9	0,00-5,06
IRF (%)	-	-	-	0,7-18,7	0,00-19,98

(\*) RET = Retikulozyten; LFR = Retikulozyten mit niedrigem Fluoreszenzanteil; MFR = Retikulozyten mit mittlerem Fluoreszenzanteil; HFR = Retikulozyten mit hohem Fluoreszenzanteil; IRF = Immature Retikulozytenfraktion.

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass sich die Ergebnisse dieser Dissertation mit den Referenzintervallen der Retikulozyten und der Retikulozytenparameter von Granats Studie in einem vergleichbaren Bereich befinden. Granats Studie hat lediglich 81 anstatt den gewünschten 120 feline Blutproben untersucht, erfüllt jedoch alle anderen Empfehlungen der IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) und des CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) (GRANAT et al., 2014). In der Literatur gibt es nur wenige Quellen zu feline Referenzintervallen auf der Basis moderner Hämatologie-Analysegeräte. Die in Tabelle 6 genannten Referenzintervalle für Retikulozyten und deren Parameter sind nach Wissen der Autorin die einzigen, die von Sysmex XT-2000iV, ProCytex DX (IDEXX Laboratories) und dem häufig als Referenzgerät angewandten ADVIA 120 für die Katze existieren. Diese Hämatologie-Analysegeräte nutzen unterschiedliche Grenzwerte innerhalb ihrer Fluoreszenzskala auf deren Basis die verschiedenen Analysegeräte Zellen in die Retikulozytenzählung ein- oder ausschließen. Auch die Differenzierung in die jeweiligen Retikulozytenparameter ist von den jeweiligen Schwellenwertsetzungen in ihre drei Reifungsstufen LFR, MFR und HFR abhängig. So zeigte in Granats Studie der Sysmex XT-2000iV bei denselben 81 feline Blutproben deutlich höhere Referenzintervalle bei der absoluten Retikulozytenzahl an und mäßig höhere bei der relativen Retikulozytenzahl. Die Retikulozytenparameter wurden von ProCytex DX nicht

gemessen und konnten somit nicht verglichen werden. Alle anderen Blutbildparameter haben jedoch bei diesen beiden Geräten sehr gut übereingestimmt (GRANAT et al., 2014). Des Weiteren hatte der Sysmex XT-2000iV höhere Retikulozytenwerte als der ADVIA 120 (BAUER et al., 2012). Die analytische Vorgehensweise der jeweiligen Geräte zur Ermittlung der Retikulozytenwerte und ihrer Parameter differiert. Ein entscheidender Faktor ist der unterschiedliche Farbstoff, der z. B. eine unterschiedliche Menge sowie unterschiedliche Inkubationszeit und Affinität zur RNA aufweist. Der ProCyte DX verwendet als Fluoreszenzfarbstoff Polymethin-Farbstoff. Der ADVIA 120 nutzt optische Technologien und Peroxidase-Technologien. Für das Anfärben der retikulozytären RNA wird der Nukleinsäurefarbstoff Oxaczin 750 verwendet. Somit können die unterschiedliche Methodik, das unterschiedliche Reagenz und der anders festgelegte Grenzbereich des Retikulozytenfensters zu den Abweichungen führen (BUTTARELLO et al., 2002). Dies unterstreicht die Notwendigkeit gerätespezifische Referenzbereiche für Parameter der Retikulozytenanalytik bei der Katze zu verwenden, solange es keine standardisierte Kalibrierung gibt.

In Anbetracht der Überschätzung des Sysmex XT-2000iV gegenüber dem ADVIA 120, dem ProCyte DX und der manuellen Auszählung (Tabelle 2) wäre eine Anpassung der Grenzwerte des Sysmex XT-2000iV für die Retikulozytenzählung bei der Katze zu überdenken. Alternativ wäre ein angemessen höherer Cut-Off-Wert für die absolute Retikulozytenzahl des Sysmex XT-2000iV in Erwägung zu ziehen. Die Anpassung hatte im Methodenvergleich dieser Dissertation zu einer verbesserten diagnostischen Aussagekraft bezüglich der Anämieklassifizierung geführt (Kapitel IV.3.). Wissenschaftler der Tiermedizin verwenden unterschiedliche Cut-Off-Werte zur Bestimmung der regenerativen Anämie auf Basis der manuellen Auszählung aggregierter Retikulozyten, die von  $15 \times 10^9$  bis  $60 \times 10^9/l$  reichen (Literaturübersicht 1.1.) Die in Tabelle 7 aufgezeigten Referenzbereiche der verschiedenen Hämatologie-Analysegeräte zeigen deutlich höhere Retikulozytenwerte bei gesunden Katzen an. Somit ist es wichtig, die in den Laboratorien verwendeten Cut-Off-Werte mit aktuellen gerätespezifischen Studien, wie der vorliegenden, abzugleichen und gegebenenfalls anzupassen. Solange es keine Standardisierung der Retikulozytenanalytik bei der Katze gibt, wird die Vergleichbarkeit von Studien auch aufgrund unter-



schiedlicher Cut-Off-Werte erschwert bleiben. Für eine verbesserte Aussagekraft sollte für jede Katze Verlaufskontrollen der Retikulozytenparameter durchgeführt werden.

## **6. Retikulozytose bei nicht anämischen Katzen**

Nicht außer Acht gelassen werden darf, dass auch gesunde Katzen und kranke Katzen ohne Anämien erhöhte Retikulozytenwerte und erhöhte Retikulozytenparameter aufweisen können. Deshalb war es innerhalb dieser Dissertation ebenfalls von Interesse, welchen Vorstellungsgrund, beziehungsweise welche Erkrankung die jeweiligen Katzen hatten, die eine Retikulozytose ohne Anämie zeigten. Alle Katzen, bei denen der Sysmex XT-2000iV über  $60 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter zählte ohne eine Anämie nachzuweisen, wurden retrospektiv anhand der in der Datenbank vermerkten Diagnosen eingeteilt (Tabelle 5). Die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie bezogen auf den gesamten Stichprobenumfang betrug 3,2 % (70/2197). Vergleichbar lag in einer Multicenterstudie, die feline Laborwerte des ProCyte Dx von sieben deutschen Tierkliniken in den Jahren 2012 bis 2014 untersuchte, die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie bei 3,1 %. In dieser Multicenterstudie wurden Werte über  $50 \times 10^9$  Retikulozyten pro Liter als eine Retikulozytose definiert (FUCHS et al., 2016). In Anbetracht der bereits behandelten Überschätzung des Sysmex XT-2000iV (Kapitel V.5.) sollte der für den Sysmex XT-2000iV verwendete höhere Cut-Off-Wert helfen, die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen. Dies kann ein Grund sein, warum trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Hämatologiegeräte die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie beider Studien sehr nahe beieinander liegt. Eine weitere Ursache kann darin begründet liegen, dass in den Stichprobenumfang beider Studien Klinikpatienten involviert waren. Klinikpatienten weisen häufig lange Anamnesen und schwerwiegende Erkrankungen auf und werden oft aus Praxen überwiesen. Die genauen Pathomechanismen sind noch nicht ausreichend geklärt, doch für die Entstehung einer Retikulozytose ohne Anämie stehen diese Mechanismen im Vordergrund: ein okkult kompensierter Blutverlust, eine kompensierte hämolytische Anämie und eine Hypoxie (JELKMANN, 2007; PATTULLO et al., 2015). Im Folgenden werden die möglichen Ätiopathogenesen einer Retikulozytose ohne Anämie anhand der dargestellten Krankheitsklassifizierung (Tabelle 6) diskutiert.

An erster Stelle stehen die neoplastischen Erkrankungen (14/86; 16,3 %) sowie Fälle bei denen meist aufgrund des klinischen Zustandes oder des Besitzerwunsches nicht weiter zwischen neoplastischer oder inflammatorischer Erkrankung unterschieden wurde (9/86; 10,5 %). Sie sind zum Teil mit Glukokortikoiden, Chemotherapeutika oder Bestrahlung behandelt worden. Diese Medikamentengruppen können eine direkte Auswirkung auf die Knochenmarkantwort haben, indem die physiologische Immunsuppression der Erythropoese gehemmt wird (TANKE et al., 1986; KING et al., 1988). Desweiteren können Glukokortikoide in Verbindung mit dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF-1) die Selbsterneuerung der eBFU-Vorläufer induzieren, welche sich zu eCFU und schließlich zu Erythrozyten ausdifferenzieren (FLYGARE et al., 2010). Außerdem können Neoplasien auch zu einem okkulten kompensierten Blutverlust, zu einer kompensierten hämolytischen Anämie oder zu einer Hypoxie aufgrund von Beeinträchtigung des Herz- oder des Atmungstraktes führen. Auch eine Invasion von Tumorzellen kann zu strukturellen Veränderungen des Knochenmarks führen, wodurch die defekte Blut-Hirn-Schranke die erythrozytären Vorläuferzellen ungeregt in die periphere Blutbahn entlässt oder diese aus dem erkrankten Knochenmark verdrängt werden. Übernimmt extramedulläres Gewebe die Aufgabe des Knochenmarks, so kann z. B. die Milz erythrozytäre Vorläuferzellen vergleichsweise nur bedingt zurückhalten und entlässt diese vermehrt in die Blutbahn (CONSTANTINO und COGIONIS, 2000).

An zweiter Stelle der Erkrankungen mit Retikulozytose ohne Anämie stehen die endokrinen Erkrankungen (9/86; 10,5 %). Wie in der Literaturübersicht unter 2.1.1.6.1. beschrieben, kann im Rahmen eines D.m., einer DKA und einer Hyperthyreose eine oxidative Hämolyse entstehen, welche die Erythropoese anregt. Schilddrüsenhormone können außerdem zu einer direkten und signifikanten Stimulation von eCFU und zu einer moderaten Zunahme der eBFU führen und damit die Erythropoese direkt beeinflussen (MALGOR et al., 1995). Auch die von Schilddrüsenhormonen induzierte  $\beta$ -adrenerge Stimulation des Knochenmarks führt zu einer gesteigerten Erythropoese (THODAY und MOONEY, 1992a; MOONEY, 2001). Möglicherweise spielt das therapeutisch eingesetzte Insulin bei D.m. oder bei der DKA eine Rolle, denn Insulin kann ebenso wie eine Hypoxie den HIF-1 $\alpha$  und Aryl-Hydrocarbon-Nuklear-Translokator-Transkriptionskomplex induzieren, welcher auch für die Genexpression von EPO mit-

verantwortlich ist (ZELZER et al., 1998).

An geteilter dritter Stelle werden dermatologische Erkrankungen sowie kardiologische / respiratorische Erkrankungen gelistet (8/86; 9,3 %). Gründe für eine Retikulozytose können ein okkult kompensierter Blutverlust durch die dermatologischen Läsionen sein. Desweiteren wurde hier zum Teil mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) behandelt, welche zu okkulten Magendarmwand-Blutungen führen können (NAIGAMWALLA et al., 2012). NSAIDs inhibieren die Cyclooxygenase und folglich die Prostaglandinsynthese, was aufgrund reduzierter Durchblutung, geringerer Schleimproduktion und gesteigerter Magensäureproduktion die Magenschleimhaut für Ulcera anfällig macht. Zudem ist der negative Feedbackmechanismus des Prostaglandins auf die Erythropoese beeinträchtigt und es kommt zu einer gesteigerten Produktion von Retikulozyten (KALAJDIEVA, 1999). Inwiefern als Vorbehandlung von anderen Tierärzten Glukokortikoide eingesetzt wurden, lässt sich retrospektiv nicht nachvollziehen, sie werden jedoch erfahrungsgemäß bei dermatologischen Erkrankungen häufig verwendet. Die hierunter fallende Stomatitis / Gingivitis / Fautitis ist in dieser Krankheitsklassifizierung am stärksten vertreten. Es ist bei den Katzen ein häufig gesehenes multifaktoriell bedingtes Syndrom, welches zu einer erhöhten Konzentration von Messenger-RNA für gewisse Interleukine und Interferon- $\gamma$  führen kann (HARLEY et al., 1999). In einer humanmedizinischen Studie konnte gezeigt werden, dass in den Fibroblasten der Gingiva Interleukin 1 auch HIF 1 induzieren kann. Jedoch ist die tatsächliche Auswirkung auf die EPO-Expression komplex und abhängig von der durch die Entzündung ausgeschütteten Zytokine (THORNTON et al., 2000).

Bei den kardiologischen und respiratorischen Erkrankungen (8/86; 9,3 %) kann es zu einer Retikulozytose aufgrund einer vorliegenden Hypoxie kommen. Die Hypoxie kann durch einen reduzierten kardialen Auswurf, Vermischung des venösen und arteriellen Blutes, ein kardiogenes Lungenödem oder eine kardiogen bedingte Thrombose entstehen. Eine Obstruktion des oberen Respirationstrakts oder eine beeinträchtigte Lungenfunktion können ebenfalls zu einer Hypoxie führen. Ist der Sauerstoffgehalt im Blut reduziert, wird dies von peritubulären interstitiellen Zellen der Nierenrinde erfasst. Durch die Hypoxie kann die Hydroxylierung der  $\alpha$ -Untereinheit nicht stattfinden, wodurch sie stabilisiert wird und sich an die  $\beta$ -Untereinheit anlagert. Hierdurch wird der Transkriptionsaktivität

von EPO verstärkt werden (HAASE, 2013). Durch erhöhte EPO-Werte kann es zu einer übermäßigen Erythropoese im Knochenmark kommen (CONSTANTINO und COGIONIS, 2000).

Am vierthäufigsten traten urologische Erkrankungen (7/86; 8,1 %) auf, wovon die Mehrzahl multimorbide Katzen waren. Hier könnten ebenfalls kompensierte okkulte Blutungen (z.B. bei CNI, Literaturübersicht 2.2.2.2.1. oder Urolithiasis) sowie der Einsatz von NSAIDs eine Rolle spielen. Auch eine Minderperfusion der Nieren kann aufgrund von Hypoxie das HIF-System aktivieren und zu einer gesteigerten Erythropoese führen (NANGAKU und ECKARDT, 2007).

An geteilter fünfter Stelle werden Katzen mit Traumata und mit gastrointestinalen Erkrankungen (5/86; 5,8 %) gelistet. Traumata können zu einer Minderperfusion der Nieren und anderer Gewebe durch Gefäßverletzungen führen. Desweiteren können Traumata einen okkulten kompensierten Blutverlust verursachen (z. B. Nachblutungen post operationem, Fremdkörper bedingte chronische Blutungen). Die NSAIDs werden häufig zur Schmerzlinderung und Entzündungshemmung eingesetzt und können, wie bereits genannt, mitverantwortlich für eine Retikulozytose ohne Anämie sein. Ist nach Traumata der Knochen oder Knorpel zu Schaden gekommen, sorgen Chondrozyten und Osteoblasten für eine Neubildung. Diese Zellen können HIF-1 und HIF-2 exprimieren und somit eine gesteigerte Erythropoese herbeiführen (RANKIN et al., 2012). Auch bei den gastrointestinalen Erkrankungen kann ein okkulter kompensierter Blutverlust über den Magendarmtrakt auftreten. So kann es bei der Inflammatory Bowel Disease zu Eisenmangel und chronischen Blutungen kommen (MUCKE et al., 2017).

An Rang sechs werden die neurologischen Erkrankungen aufgeführt, bei denen in der vorliegenden Patientengruppe nur die Epilepsie (4/86; 4,7 %) mit Retikulozytose ohne Anämie aufzufinden war. Bei der Epilepsie und ihrer postiktalen Phase kann es zu einer akuten Hypoxie kommen (FARRELL et al., 2016).

An siebter Stelle stehen die Hepatopathien (3/86; 3,5 %). Bei den chronischen Hepatopathien können Blutungen vor allem in den Magendarmtrakt auftreten. Schwere hepatozelluläre Erkrankungen können zu einer reduzierten Produktion von Gerinnungsfaktoren oder zu einer primären Hämostasestörung und damit zu Blutungen führen (GONZALEZ-CASAS et al., 2009). Treten diese Blutungen in geringem Ausmaß und okkult auf, kann es zu einer Retikulozytose ohne Anämie

kommen. Die Kapazität der Leber Erythrogenin, die Vorstufe des EPO, zu produzieren, nimmt mit zunehmendem Alter ab (KAPLAN et al., 1975). Doch sich regenerierendes Lebergewebe scheint wieder vermehrt die Funktion der extrarenalen Erythrogenin- und EPO-Produktion aufzunehmen (ROTHMANN et al., 1982).

An Platz acht standen gynäkologische Komplikationen (2/86; 2,3 %). In vitro konnte gezeigt werden, dass Prolaktin, ein wichtiges Hormon während der Trächtigkeit für das Wachstum der Mammakomplexe und für die Milchsekretion nach der Geburt, die Erythropoese stimuliert (BELLONE et al., 1997).

An neunter Stelle stehen die orthopädischen Erkrankungen (1/86; 1,2 %). Wie schon bei den Traumata erwähnt, können Chondrozyten und Osteoblasten HIF-1 und HIF-2 exprimieren. In verschiedenen orthopädischen Erkrankungen sind somit diese Transkriptionsfaktoren überrepräsentiert. So konnte nachgewiesen werden, dass HIF-1 $\alpha$  je nach Schweregrad einer Osteoarthritis zunimmt (PFANDER et al., 2005). In degeneriertem Knorpel wird vorwiegend HIF-2 $\alpha$  gebildet (MARIANI et al., 2014). Häufig werden orthopädische Erkrankungen mit NSAIDs therapiert.

Vier sonstige Erkrankungen (4/86; 4,7 %) traten auf, wovon eine chronisch kranke Katze in Seitenlage auf Besitzerwunsch nicht mehr weiter abgeklärt wurde. Eine Katze mit Mucopolysaccharidose könnte aufgrund von degenerativen Gelenkerkrankungen und Skelettdeformationen vermehrt die Transkriptionsfaktoren HIF exprimiert haben. Desweiteren könnte im Rahmen dieser Erkrankung das Knochenmark aufgrund der Skelettdeformation direkt dysreguliert sein. Der Dismorphismus des Gesichtsschädels, sowie Hypoplasie der Trachea, verdickte Herzklappen und Anfallsgeschehen als Folge der Erkrankung (GITZELMANN et al., 1994; SCHULTHEISS et al., 2000) könnten zu einer Hypoxie führen. Eine Katze litt unter einer Angiomatose. Die bei Katzen meist peripher an Gliedmaßen auftretenden arteriovenösen Fisteln (SANTORO et al., 2009) könnten zu einer lokalen Hypoxie führen. Eine weitere Katze zeigte eine idiopathische Hypertension mit konsekutivem Hyphaema. Somit könnte die Hypertension für eine chronische okkulte Blutung verantwortlich gemacht werden. Desweiteren konnte bei Versuchstieren eine positive Korrelation zwischen Hypertension und Erythropoese nachgewiesen werden. Als Ursache wird eine geringere oder veränderte Perfusion der Nieren aufgrund der

Hypertension postuliert (SEN et al., 1972).

Die in der Diskussion dargelegten möglichen Ätiopathogenesen einer Retikulozytose ohne Anämie lassen sich anhand der Krankheitsklassifizierung in Tabelle 6 folgendermaßen zusammenfassen: Knochenmarkumbau (Klasse 1, 2), extra-medulläre Erythropoese (Klasse 1, 2, 10, 12), Hypoxien (Klasse 1, 2, 5, 6, 7, 9), okkulte kompensierte Blutungen (Klasse 1, 2, 4, 6, 7, 8), kompensierte Hämolyse (Klasse 1, 2, 3), Stimulation der EPO-Produktion (Klasse 3, 11, 12), Bestrahlung (Klasse 1, 2), Immunsuppressiva und NSAID (Klasse 1, 2, 4, 6, 7, 9, 12).

Hervorzuheben ist die Tatsache, dass eine Retikulozytose kein Kriterium für eine Anämie ist, sondern für eine gesteigerte Erythropoese, die auch aufgrund oben genannter intrinsischer und extrinsischer Faktoren induziert werden kann.

Bei sieben Katzen mit einer Retikulozytose war retrospektiv kein Hinweis auf eine Krankheit zu finden (7/86; 8,1 %). Physiologischerweise können vorübergehende Aufregung und körperliche Anstrengung aufgrund einer Milzkontraktion zu einer Retikulozytose führen (GEIGER et al., 1976; HORVATH et al., 2014). Auch Stress kann bei Katzen Magenulzera verursachen (PEARL et al., 1966), was wiederum einen kompensierten okkulten Blutverlust zur Folge haben kann. Möglicherweise können Freigänger-Katzen, die viel jagen, aufgrund von einer kompensierten Hämolyse eine Retikulozytose aufweisen. In einer humanmedizinischen Studie wurde bei Läufern die Hämolyse der Erythrozyten aufgrund mechanischer Schädigung in den Kapillaren durch den Fuß-Auftritt beim Rennen verantwortlich gemacht. Zusätzlich kann oxidativer Stress zu einem geringen Anstieg von Methämoglobin führen (TELFORD et al., 2003). Da zwei der sieben Katzen Blutspender waren, kann es zu einem kompensierten Blutverlust gekommen sein. In humanmedizinischen Studien führten Blutabnahmen zu einer Eisenmangelanämie (SEMMELOCK et al., 2012), welche wegen der erhöhten Konzentration an Transferrin Rezeptor Messenger-RNA mehr Zellen mit erhöhter Fluoreszenz anzeigen kann (Literaturübersicht 2.1.2.2.) und zu erhöhten Retikulozytenzahlen führen kann (TANKE et al., 1983). Zwei der sieben als gesund geltenden Katzen wurden innerhalb der nächsten drei Jahre aufgrund eines intestinalen Lymphoms und einer präkardialen Masse eingeschläfert. Inwiefern eine Retikulozytose ohne Anämie ein frühzeitiger negativer prognostischer Faktor sein könnte, ist noch ungewiss. In der Multicenterstudie, die feline Laborwerte des ProCyte Dx von sieben deutschen Tierkliniken untersuchte, lag die Mortalitätsrate

bei Katzen mit Retikulozytose ohne Anämie bei 37,8 % (FUCHS et al., 2016). Diese Mortalitätsrate sollte in Anbetracht der Klinikpopulation mit meist schwerwiegenderen Erkrankungen vorsichtig bewertet werden. So zeigen die Referenzwerte gesunder Katzen ohne Anämie im Rahmen einer Gesundheitsvorsorge, dass auch hier erhöhte Retikulozytenwerte vorliegen können (GRANAT et al., 2014). Somit ist es wichtig die Aussage über Mortalitätsraten in Bezug auf eine Retikulozytose ohne Anämie in Zusammenhang mit der Patientenpopulation und unter Berücksichtigung gerätespezifischer Referenzwerte zu evaluieren. In der Multicenterstudie waren 1,8 % der 124 Katzen mit Retikulozytose ohne Anämie gesund (FUCHS et al., 2016). Diese geringere Prävalenz von gesunden Katzen im Vergleich zu den in dieser Dissertation ermittelten 8,1 % kann möglicherweise daran liegen, dass der Sysmex XT-2000iV im Vergleich zu dem ProCyt Dx in der Literatur deutlich höhere Referenzwerte der Retikulozyten ermittelte (Tabelle 6). Ähnlich wie es in der vorliegenden Dissertation der Fall war, waren kardiologische oder respiratorische Erkrankungen, gefolgt von Blutverlust, gastrointestinalen, neoplastischen, inflammatorischen, orthopädischen und neurologischen Erkrankungen ursächlich für die Retikulozytose ohne Anämie (FUCHS et al., 2016). In einer Studie zur Retikulozytose ohne Anämie bei Hunden lag die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie bei 2,1 %. Der Cut-Off-Wert für eine Retikulozytose lag bei  $\geq 2,5$  % und das Blutbild wurde mit dem Hämatologie Analysegerät Cell-Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) ermittelt. Wie bei den Erkrankungen der Katzen konnten viele Faktoren für eine chronische Blutung verantwortlich gemacht werden. Anders als bei den Katzen waren kardial oder pulmonär bedingte Hypoxien jedoch nur von untergeordneter Bedeutung. Es konnte eine zunehmende Prävalenz für eine Retikulozytose ohne Anämie über die Jahre 2000-2012 festgestellt werden. Diese Tendenz legte eine große Bedeutung der häufigeren Verabreichung von NSAIDs und Immunsuppressiva nahe. Auch die vermehrte Supplementierung von Glukosaminen, mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren und Zink enthaltenden Produkten, sowie das Vorliegen einer Osteoarthritis schienen für die Retikulozytose verantwortlich zu sein (PATTULLO et al., 2015). Durch das gesteigerte Bewusstsein der Besitzer ihre Tiere gesund zu ernähren werden diese Produkte gerne auch prophylaktisch eingesetzt. So enthalten vor allem Diäten und Nutrazeutika für Knochen- und Gelenkerkrankungen, sowie für urologische

Erkrankungen Glukosamine und Omega-3-Fettsäuren. Letztere sind auch in speziellen Diäten für dermatologische, neurologische, gastrointestinale, neoplastische und thyreoidaler Erkrankungen vertreten. Bei Katzen können spezielle Dosierungen von Omega-3-Fettsäuren unterschiedliche Nebenwirkungen aufweisen. Eine Studie fasst diese zusammen, wobei eine verminderte Thrombozytenaggregation und gastrointestinale Symptome (LENOX und BAUER, 2013) zu einem okkulten kompensierten Blutverlust führen könnten. Weitere Nebenwirkungen bei Katzen können eine Beeinträchtigung des Immunsystems aufgrund höherer Konzentrationen von Leukotrienen B5 und eine verstärkte Sensitivität auf Insulin sein. Die Serie fünf der Leukotriene kann die Thrombozytenaggregation negativ beeinflussen (LENOX und BAUER, 2013) und Insulin kann, wie bereits diskutiert, Einfluss auf die EPO-Produktion nehmen. Glucosamine können in seltenen Fällen zu einer verlängerten Prothrombinzeit, Epistaxis, Gingiva-Blutungen, Alopezie, zu gastrointestinalen Symptomen und Insulinresistenz führen (MULHOLLAND et al., 1990; MONAUNI et al., 2000). Bei Katzen scheinen sie jedoch keine klinisch signifikanten hämatologischen oder hämostatischen Nebenwirkungen hervorzurufen (MCNAMARA et al., 1999), wobei die Retikulozytenwerte moderner Hämatologie-Analysegeräte von Interesse wären. Zusammenfassend könnten oben genannte Produkte weitere extrinsische Faktoren sein, warum bei nicht anämischen oder gesunden Katzen z. B. im Rahmen einer Gesundheitsvorsorge eine Retikulozytose im Blutbild nachgewiesen werden kann.

Limitierend bei der Bestimmung der Wertebereiche für die Parameter der Retikulozytenanalytik ist die Auswahl von retrospektiven Daten. Nur anhand der retrospektiven Daten lässt sich sicher eine Auskunft über die Labordaten geben, nicht jedoch über den tatsächlichen Krankheitszustand der Katzen. Auch die Aussagen über mögliche Vorbehandlungen durch andere Tierärzte sind nicht definitiv. Die ermittelten Wertebereiche gelten lediglich als möglicher Anhaltspunkt für Auswertungen mit dem Sysmex XT-2000iV. Sie spiegeln eine repräsentative Klinikpopulation von hauptsächlich erkrankten, nicht anämischen Katzen wider. Literaturvergleiche von Parametern der maschinellen Retikulozytenanalytik sind eingeschränkt zu beurteilen, da sie sich von der Anzahl, der präanalytischen Aufbereitung und der analytischen Durchführung der unterschiedlichen Hämatologie-Analysegeräte unterscheiden.



## 7. Schlussfolgerung

Die inzwischen mehrheitlich vollzogene Umstellung von der manuellen auf die maschinelle Retikulozytenzählung ließ die Frage aufkommen, ob die ermittelten Werte gleichwertig in der klinischen Diagnostik verwendet werden können. Dies ist eindeutig zu bejahen. Die manuelle Auszählung aggregierter Retikulozyten und die maschinell ermittelte Retikulozytenzahl sind gut vergleichbare Parameter, auch wenn die maschinelle gegenüber der manuellen Zählung ein Bias von  $+ 21,45 \times 10^9/l$  aufweist. Wird dieses Bias bei der Differenzierung zwischen regenerativer und aregenerativer Anämie berücksichtigt, kommt man in den meisten Fällen mit beiden Methoden zu der gleichen Diagnose.

Die IRF steht bei anämischen Katzen in keiner Übereinstimmung zu den aggregierten Retikulozyten. Trotzdem zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass die IRF auch bei der Katze ein sensibler Parameter ist, um eine Regeneration zu erkennen. Wegen der hohen Bedeutung des Symptomenkomplexes Anämie bei der Katze könnte dieser Parameter zukünftig eine wichtige klinisch diagnostische Bedeutung erlangen, um früher und zuverlässiger eine Regeneration im Therapieverlauf einer Anämie zu erkennen. Weitere Studien werden benötigt, um den Stellenwert der IRF in speziellen Erkrankungen der Katze, z. B. einer durch CNI verursachten Anämie unter EPO-Therapie, zu beurteilen. Die Standardisierung und Kalibrierung von Hämatologie-Analysegeräten kann den CV der Parameter der Retikulozytenanalytik optimieren. In Anbetracht der höheren Retikulozytenwerte des Sysmex XT-2000iV gegenüber der manuellen Zählung und verschiedener anderer Hämatologie-Analysegeräte sowohl bei anämischen, nicht anämischen und gesunden Katzen, sollten die Parameter der Retikulozytenanalytik gerätespezifisch beurteilt werden. Auftretende Retikulozytosen ohne Anämien, welche 3,2 % einer typischen felines Klinikpopulation ausmachten, sollten zudem frühzeitig auf beschriebene Erkrankungen und mögliche Ätiopathogenesen untersucht werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die Parameter der Retikulozytenanalytik des Sysmex XT-2000iV bei Katzen zu beurteilen. Hierbei wurden die Retikulozytenwerte und die Retikulozytenparameter des Sysmex mit der entsprechenden manuellen Retikulozytenzählung anämischer Katzen verglichen und ein besonderes Augenmerk auf die Übereinstimmung der Anämieklassifizierung in regenerativ und aregenerativ gelegt. Desweiteren wurden gerätespezifische Wertebereiche für die maschinellen Parameter der Retikulozytenanalytik einer repräsentativen nicht anämischen Klinikpopulation ermittelt und die Prävalenz sowie mögliche Ätiopathogenesen einer Retikulozytose ohne Anämie untersucht.

Für den Methodenvergleich wurden Retikulozyten von 50 anämischen Katzen manuell ausgezählt und mit den maschinellen Werten anhand einer Bland-Altman Analyse und einer Passing-Bablok Regression verglichen. Um die Präzision des Sysmex zu bestimmen, wurden 20 Doppelmessungen durchgeführt. Die Übereinstimmung der diagnostischen Aussagekraft zwischen der maschinellen und manuellen Retikulozytenzählung in Hinblick auf eine regenerative oder aregenerative Anämie wurde mithilfe des Cohen's Kappa Koeffizienten ( $\kappa$ ) aufgezeigt. Die diagnostische Aussagekraft der Immaturen Retikulozytenfraktion (IRF) für eine Klassifizierung in regenerative oder aregenerative Anämie wurde mithilfe von Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven aufgezeigt.

Die beste Übereinstimmung wurde zwischen der maschinellen Retikulozytenzählung und den aggregierten Retikulozyten mit einem Bias von  $+ 21,45 \times 10^9/l$  gefunden. Trotz des positiven Bias zeigte der  $\kappa$  von 0,69 eine gute Übereinstimmung. Hierbei wurde für die Retikulozyten ein Cut-Off-Wert von  $> 40 \times 10^9/l$  für das Aufzeigen einer Regeneration gewählt. Durch die Erhöhung des für den Sysmex angewandten Cut-Off-Wertes entsprechend des Bias auf  $> 61 \times 10^9/l$ , wurde eine deutlich bessere Übereinstimmung ( $\kappa = 0,88$ ) ermittelt. Es konnte mittels ROC-Kurve gezeigt werden, dass die IRF (%) bei einem Cut-Off-Wert von 13,7 % die beste Sensitivität und Spezifität (85,0 %; 76,7 %) aufwies, um die Anämie in regenerativ und aregenerativ zu klassifizieren. Die Verwendung absoluter Werte der IRF übertraf bei einem Cut-Off-Wert von  $5,69 \times 10^9/l$  die Sensitivität und Spezifität (90,0 %; 96,7 %) des relativen Wertes der IRF. Die

Präzision der maschinellen Retikulozytenzählung hatte mit einem moderaten Wert von 10,3 % einen besseren Variationskoeffizienten als die manuelle Retikulozytenzählung in vergleichbaren Studien.

Aus einer repräsentativen felineen Klinikpopulation ( $n = 2197$ ) wurden 165 Blutproben nicht anämischer Katzen selektiert, um gerätespezifische Wertebereiche der Parameter der Retikulozytenanalytik zu ermitteln. Die Prävalenz einer Retikulozytose ohne Anämie wurde bestimmt und die Klinikhistorie der entsprechenden Katzen recherchiert.

Vergleicht man die Referenzintervalle des Sysmex XT-2000iV von Granats Studie mit den hier ermittelten Wertebereichen nicht anämischer Katzen, so lassen sich deutliche Parallelen erkennen. Die Retikulozytenzahlen, die von Sysmex XT-2000iV gemessen werden, sind höher als die anderer Hämatologie-Analysegeräte.

Die Prävalenz einer Retikulozytose bei nicht anämischen Katzen betrug 3,2 % (70/2197). Potentiell prädisponierende intrinsische und extrinsische Faktoren für eine gesteigerte Erythropoese lagen insbesondere bei folgender felineer Krankheitsklassifizierung dieser 70 Katzen (86 Diagnosen) vor: neoplastisch (14/86; 16,3 %), neoplastisch versus inflammatorisch (9/86; 10,5 %), endokrin (9/86; 10,5 %), dermatologisch (8/86; 9,3 %), kardiologisch / respiratorisch (8/86; 9,3 %), urologisch (7/86; 8,1 %), traumatisch (5/86; 5,8 %), gastrointestinal (5/86; 5,8 %), neurologisch (4/86; 4,7 %), hepatisch (3/86; 3,5 %), gynäkologisch (2/86; 2,3 %), orthopädisch (1/86; 1,2 %), sonstige (4/86; 4,7 %), keine Krankheitsdiagnose (7/86; 8,1 %).

Die maschinelle Retikulozytenzählung stimmt am besten mit der manuellen Auszählung aggregierter Retikulozyten bei anämischen Katzen überein. Die IRF ist neben der maschinellen Retikulozytenzählung ein geeigneter Parameter um die Anämie in regenerativ und aregenerativ zu klassifizieren. Weitere Studien werden benötigt, um die Relevanz der IRF hinsichtlich Anämie verursachender Erkrankungen zu evaluieren. Solange keine Standardisierung und Kalibrierung der Hämatologie-Analysegeräte vorliegt, ist eine gerätespezifische Beurteilung der Parameter der Retikulozytenanalytik empfehlenswert. Tritt bei nicht anämischen oder gesunden Katzen eine Retikulozytose auf, dienen die genannten potentiell prädisponierenden Faktoren als Orientierung für die weitere diagnostische Aufarbeitung.

## VII. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the automated reticulocyte parameter results of Sysmex XT-2000iV in cats. For this purpose, the automated reticulocyte count and the reticulocyte parameters were compared to the corresponding manual reticulocyte count in anaemic cats. Particular attention was given to the agreement of both methods in classifying anaemia into regenerative and non-regenerative. In addition, device-specific value ranges of the automated reticulocyte parameter results in a representative non-anaemic clinic population were determined. The prevalence as well as possible aetiopathogenesis for a reticulocytosis without anaemia was examined.

For the method comparison, reticulocytes of 50 anaemic cats were counted manually and compared with the automated count of Sysmex XT-2000iV using Bland-Altman analysis and Passing-Bablok regression. In order to determine the precision of the Sysmex, 20 repeated measurements were performed. The agreement of the diagnostic conclusion between automatic and manual reticulocyte count regarding regenerative and aregenerative anaemia were shown by the Cohen's Kappa coefficient ( $\kappa$ ). The diagnostic value of the Immature Reticulocyte Fraction (IRF) for classification in regenerative and aregenerative anaemia was determined by Receiver-Operating-Characteristic (ROC) curves.

The best agreement was identified between the automated reticulocyte count and the aggregated reticulocytes with a bias of  $+21.45 \times 10^9/l$ . Despite this positive bias,  $\kappa$  of 0.69 showed a good agreement using a cut-off value of  $>40 \times 10^9$  reticulocytes per litre to classify regeneration. When the cut-off value of the reticulocytes measured by Sysmex XT-2000iV was leveled in accordance with the bias, the new cut-off value of  $>61 \times 10^9$  reticulocytes per litre obtained a considerably better agreement ( $\kappa = 0.88$ ). Regarding the ROC-curve, it could be shown that the IRF (%) with a cut-off value of 13.7% showed the best sensitivity and specificity (85.0%; 76.7%) to classify anaemia into regenerative and aregenerative anaemia. The absolute value of the IRF with a cut-off value of  $5.69 \times 10^9/l$  exceeded the sensitivity and specificity (90.0%; 96.7%) of the relative value of the IRF. The precision of the automated reticulocyte count had a better, however moderate coefficient of variation of 10.3% than the manual reticulocyte

count found in comparable studies.

A number of 165 blood samples of non-anaemic cats were selected out of a representative feline clinic population ( $n = 2194$ ) to calculate device-specific value ranges of the reticulocyte parameters. The prevalence of reticulocytosis without anaemia was determined and the clinical history of the corresponding cats was researched.

Reference intervals of feline reticulocytes and reticulocyte parameters of former studies were compared with the results of this study. The reference intervals measured by the Sysmex XT-2000iV in Granat's study clearly show parallels to the value ranges of this dissertation. The automated reticulocyte count measured by Sysmex XT-2000iV is noticeably higher than the reticulocyte count of other haematology analysers.

The prevalence of reticulocytosis in non-anaemic cats was 3.2% (70/2197). Potential predisposing intrinsic and extrinsic factors for an increased erythropoiesis especially exist in the following feline disease classification of these 70 cats with their 86 diagnoses: neoplastic (14/86; 16.3%), neoplastic versus inflammatory (9/86; 10.5%), endocrine (9/86; 10.5%), dermatological (8/86; 9.3%), cardiological / respiratory (8/86; 9.3%), urological (7/86; 8.1%), traumatic (5/86; 5.8%), gastrointestinal (5/86; 5.8%), neurological (4/86; 4.7%), hepatic (3/86; 3.5%), gynaecological (2/86; 2.3%), orthopaedic (1/86; 1.2%), other (4/86; 4.7%), no disease diagnosis (7/86; 8.1%).

The automated reticulocyte count agrees best with the aggregated reticulocyte count in anaemic cats. As well as the automated reticulocyte count, the IRF is an useful parameter to classify anaemia into regenerative or non-regenerative. Further studies are required to evaluate the relevance of the IRF for specific diseases causing anaemia. As long as no standardisation and no calibration of the haematology analysers exist, a device-specific evaluation of the reticulocyte parameter results is recommended. If reticulocytosis occurs in non-anaemic or healthy cats, the potential predisposing factors provide guidance for further diagnostic purposes.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott DL, McGrath JP. Evaluation of flow cytometric counting procedure for canine reticulocytes by use of thiazole orange. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52: 723-7.

Abkowitz JL, Holly RD, Segal GM, Adamson JW. Multilineage, non-species specific hematopoietic growth factor (s) elaborated by a feline fibroblast cell line: Enhancement by virus infection. *J. Cell. Physiol.* 1986; 127: 189-96.

Abkowitz JL, Holly RD, Grant CK. Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. Hematopoietic progenitors are infected with feline leukemia virus and erythroid burst-forming cells are uniquely sensitive to heterologous complement. *J. Clin. Invest.* 1987; 80: 1056.

Adams LG, Hardy RM, Weiss DJ, Bartges JW. Hypophosphatemia and Hemolytic Anemia Associated With Diabetes Mellitus and Hepatic Lipidosis in Cats. *J. Vet. Intern. Med.* 1993; 7: 266-71.

Addie DD, Jarrett O. Feline Coronavirus Infections. In: *Infectious diseases of the dog and the cat*. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Saunders 2006: 88-102.

Aird B. Acute Blood Loss Anemia. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th edn. Feldmann BG, Zinkl JG, Jain NC, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000: 151-3.

Alleman AR, Pate MG, Harvey JW, Gaskin JM, Barbet AF. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 1474-9.

Altman DG (1991) *Practical statistics for medical research*, 1st edn. Chapman and Hall, London. 403-9.

Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 2001; 131: 955S-62S.

Andress JL, Day TK, Day DG. The effects of consecutive day propofol anesthesia on feline red blood cells. *Vet. Surg.* 1995; 24: 277-82.

Antonijević N, Nesović M, Trbojević B, Milosević R. [Anemia in hypothyroidism]. *Med. Pregl.* 1998; 52: 136-40.

Arjona A, Escolar E, Soto I, Barquero N, Martin D, Gomez-Lucia E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 3448-9.

Aronson LR, Drobatz K. Acetaminophen toxicosis in 17 cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 1996; 6: 65-9.

Aucoin DP, Peterson ME, Hurvitz AI, Drayer DE, Lahita RG, Quimby FW, Reidenberg MM. Propylthiouracil-induced immune-mediated disease in the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985; 234: 13-8.

Baker R, Valli V. Dysmyelopoiesis in the cat: a hematological disorder resembling refractory anemia with excess blasts in man. *Can. J. Vet. Res.* 1986; 50: 3.

Balci YI, Akpinar FO, Polat A, Uzun U, Ergin A. Evaluation of Reticulocyte Parameters in Iron Deficiency, Vitamin B12 Deficiency and Mixed Anemia. *Clin. Lab.* 2016; 62: 343-7.

Baneth G, Kenny MJ, Tasker S, Anug Y, Shkap V, Levy A, Shaw SE. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 99-105.

Barger AM. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2003; 33: 1207-22.

Bauer N, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV (TM) compared to the ADVIA (R) 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24: 74-89.

Bellone G, Astarita P, Artusio E, Silvestri S, Mareschi K, Turletti A, Buttiglieri S, Emanuelli G, Matera L. Bone marrow stroma-derived prolactin is involved in basal and platelet-activating factor-stimulated in vitro erythropoiesis. *Blood* 1997; 90: 21-7.

Biswas N, Ahn Y, Goldmann JM, Schwartz JM. Aplastic anemia associated with antithyroid drugs. *The American journal of the medical sciences* 1991; 301: 190-4.

Blaha-Kaplans HJ. Bestimmung der Referenzbereiche für die Parameter des großen Blutbildes und der Retikulozyten gesunder Erwachsener mit den Hämatologie-Analysensystemen Siemens ADVIA 120, Abbott CELL-DYN Sapphire, Sysmex XT-2000i und Sysmex XE-2100. Diss. med. vet. 2013. Universitätsbibliothek der TU München.

Bley CR, Roos M, Price J, Ruess-Melzer K, Buchholz J, Poirier V, Kaser-Hotz B. Clinical assessment of repeated propofol-associated anesthesia in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007; 231: 1347-53.

Bloom JC, Brandt JT. Toxic responses of the blood. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (Casarett LJ Doull J, Klaassen CD, eds). 6th ed. New York: McGraw-Hill 2001: 389-417.

Blouin EF, Kocan AA, Glenn BL, Kocan KM, Hair JA. Transmission of Cytauxzoon felis Kier, 1979 from bobcats, Felis rufus (Schreber), to domestic cats by Dermacentor variabilis (Say). *J. Wildl. Dis.* 1984; 20: 241-2.

Blue J, Weiss L. Vascular pathways in nonsinusal red pulp—an electron



microscope study of the cat spleen. *Am. J. Anat.* 1981; 161: 135-68.

Bogin E, Massry SG, Levi J, Djaldeti M, Bristol G, Smith J. Effect of parathyroid hormone on osmotic fragility of human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1982; 69: 1017.

Brada S, de Wolf J, Hendriks D, Esselink M, Ruiters M, Vellenga E. The supportive effects of erythropoietin and mast cell growth factor on CD34+/CD36-sorted bone marrow cells of myelodysplasia patients. *Blood* 1996; 88: 505-10.

Braddock JA, Tasker S, Malik R. The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. *J. Feline Med. Surg.* 2004; 6: 161-5.

Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am. J. Clin. Pathol.* 1949; 19: 895-.

Breuer W, Stahr K, Majzoub M, Hermanns W. Bone-marrow changes in infectious diseases and lymphohaemopoietic neoplasias in dogs and cats-a retrospective study. *J. Comp. Pathol.* 1998; 119: 57-66.

Breuer W, Darbes J, Hermanns W, Thiele J. Idiopathic myelofibrosis in a cat and in three dogs. *Comparative Haematology International* 1999; 9: 17-24.

Breznock EM, Strack D. Blood volume of nonsplenectomized and splenectomized cats before and after acute hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* 1982; 43: 1811-4.

Briggs C, Grant D, Machin SJ. Comparison of the Automated Reticulocyte Counts and Immature Reticulocyte Fraction Measurements Obtained With the ABX Pentra 120 Retic Blood Analyzer and the Sysmex XE-2100 Automated Hematology Analyzer. *Laboratory Hematology* 2001; 7: 75-80.

Brugnara C. Reticulocyte Cellular Indices: A New Approach in the Diagnosis of

Anemias and Monitoring of Erythropoietic Function. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2000; 37: 93-130.

Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. Clin. Lab. Haematol. 2006; 28: 303-8.

Bücheler J, Giger U. Alloantibodies against A and B blood types in cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 1993; 38: 283-95.

Bücheler J. Fading kitten syndrome and neonatal isoerythrolysis. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1999; 29: 853-70.

Buttarello M, Bulian P, Pra MD, Barbera P, Rizzotti P. Reticulocyte quantification by Coulter MAXM VCS (volume, conductivity, light scatter) technology. Clin. Chem. 1996; 42: 1930-7.

Buttarello M, Bulian P, Farina G, Petris MG, Temporin V, Toffolo L. Five Fully Automated Methods for Performing Immature Reticulocyte Fraction Comparison in Diagnosis of Bone Marrow Aplasia. Am. J. Clin. Pathol. 2002; 117: 871-9.

Buttarello M, Temporin V, Ceravolo R, Farina G, Bulian P. The New Reticulocyte Parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100 Its Use in the Diagnosis and Monitoring of Posttreatment Sideropenic Anemia. Am. J. Clin. Pathol. 2004; 121: 489-95.

Casman EP. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol. 1960; 79: 849.

Center SA, Crawford MA, Guida L, Erb HN, King J. A Retrospective Study Severe Hepatic of 77 Cats With Lipidosis: 1975-1990. J. Vet. Intern. Med. 1993; 7: 349-59.

Center SA. Feline Hepatic Lipidosis. In: Richards, J R. Practice VCoNASA, ed.

Philadelphia: Saunders 2005: 225-69.

Chalhoub S, Langston CE, Farrelly J. The use of darbepoetin to stimulate erythropoiesis in anemia of chronic kidney disease in cats: 25 cases. *J. Vet. Intern. Med.* 2012; 26: 363-9.

Chang CC, Kass L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 108: 69-73.

Choi JW, Pai SH. Reticulocyte Subpopulations and Reticulocyte Maturity Index (RMI) Rise as Body Iron Status Falls. *Am. J. Hematol.* 2001; 67: 130-5.

Christopher MM. Relation of endogenous Heinz bodies to disease and anemia in cats: 120 cases (1978-1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989; 194: 1089-95.

Christopher MM, Perman V, Eaton JW. Contribution of propylene glycol-induced Heinz body formation to anemia in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989; 194: 1045-56.

Christopher MM, White JG, Eaton JW. Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body-mediated hemolysis in cats. *Veterinary Pathology Online* 1990; 27: 299-310.

Christopher MM, Broussard JD, Peterson ME. Heinz body formation associated with ketoacidosis in diabetic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 1995; 9: 24-31.

Christopher MM. Disorders of feline red blood cells. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy*, 13th edn. Bonagura JD, ed. Philadelphia: Saunders 2000: 421-4.

Clague MJ, Cherry RJ. A comparative study of band 3 aggregation in erythrocyte membranes by melittin and other cationic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1989; 980: 93-9.

Cohn LA. Pulmonary Parenchymal Disease. In: Veterinary internal medicine, 7th edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Philadelphia, PA: Saunders 1995: 1096-119.

Constantino BT, Cogionis B. Nucleated RBCs—Significance in the Peripheral Blood Film. *Laboratory Medicine* 2000; 31: 223-9.

Cotter SM, Essex M. Animal model: feline acute lymphoblastic leukemia and aplastic anemia. *Am. J. Pathol.* 1977; 87: 265.

Cotter SM. Feline viral neoplasia. In: Infectious diseases of the dog and cat, 2nd edn. Greene CE, ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders 1998: 71-84.

Cotter SM. Non-Regenerative Anemia. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ettinger SJ, Feldmann EC, eds. Philadelphia: Saunders 2000: 1804-16.

Courchamp F, Yoccoz NG, Artois M, Pontier D. At-risk individuals in Feline Immunodeficiency Virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). *Epidemiol. Infect.* 1998; 121: 227-36.

Couto CG. Update on feline haematology. *J. Feline Med. Surg.* 2001; 3: 177-9.

Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2003; 33: 1223-44.

Craig KJ, Williams JD, Riley SG, Smith H, Owens DR, Worthing D, Cavill I, Phillips AO. Anemia and Diabetes in the Absence of Nephropathy. *Diabetes Care* 2005; 28: 1118-23.

Culp W, Drobatz K, Glassman M, Baez J, Aronson L. Feline Visceral Hemangiosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2008; 22: 148-52.

D'Onofrio G, Kuse R, Foures C, Jou J, Pradella M, Zini G. Reticulocytes in

haematological disorders. Clin. Lab. Haematol. 1996; 18: 29-34.

David O, Grillo A, Ceoloni B, Cavallo F, Podda G, Biancotti P, Bergamo D, Canavese C. Analysis of red cell parameters on the Sysmex XE 2100 and ADVIA 120 in iron deficiency and in uraemic chronic disease. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2006; 66: 113-20.

Davis B. Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity. Lab. Hematol. 1996; 2: 2-8.

Davis BH. Report on the ISLH-sponsored immature reticulocyte fraction (IRF) workshop. Lab. Hematol. 1997; 3: 261-3.

De Tommasi AS, Otranto D, Furlanello T, Tasca S, Cantacessi C, Breitschwerdt EB, Stanneck D, Dantas-Torres F, Baneth G, Capelli G. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. Parasitol. Vectors 2014; 7: 534.

Eckmann M. Anämien bei der Katze. Diss. med. vet. 2005. Freien Universität Berlin.

Estrin MA, Wehausen CE, Lessen CR, Lee JA. Disseminated intravascular coagulation in cats. J. Vet. Intern. Med. 2006; 20: 1334-9.

Evans R, Gruffydd-Jones T. Anaemia in cats. In Pract. 1984; 6: 168-77.

Farrell JS, Gaxiola-Valdez I, Wolff MD, David LS, Dika HI, Geeraert BL, Rachel Wang X, Singh S, Spanswick SC, Dunn JF, Antle MC, Federico P, Teskey GC. Postictal behavioural impairments are due to a severe prolonged hypoperfusion/hypoxia event that is COX-2 dependent. eLife 2016; 5: e19352.

Fathi E, Atyabi N, Sharifi Yazdi H, Nassiri SM. Immune-mediated hemolytic anemia in cats referring to Veterinary Teaching Hospital of Tehran (2006-2007).

Iranian Journal Of Veterinary Research (IJVR) 2009; 10: 373-7.

Feldman EC, Ettinger SJ. Immun-Mediated Hemolytic Anemia and Other Regenerative Anemias. In: Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the cat and dog, 7th edn. Mitchell K, Kruth S, eds. St. Louis, Missouri: Elsevier 2000: 761-72.

Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. Hematol. Cell Ther. 1996; 38: 363-80.

Feussner JR, Shelburne JD, Bredehoeft S, Cohen HJ. Arsenic-induced bone marrow toxicity: ultrastructural and electron-probe analysis. Blood 1979; 53: 820-7.

Fitzgerald KT, Flood AA. Hymenoptera stings. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 2006; 21: 194-204.

Flygare J, Estrada VR, Shin C, Gupta S, Lodish H. Stress Erythropoiesis: HIF-1 Alpha Synergizes with Glucocorticoids to Induce BFU-E Progenitor Self-Renewal. Blood 2010; 116: 814.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1997; 210: 1313-8.

Foley JE, Pedersen NC. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', a low-virulence epierythrocytic parasite of cats. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001; 51: 815-7.

Frontera-Acevedo K, Balsone NM, Dugan MA, Makemson CR, Sellers LB, Brown HM, Peterson DS, Creevy KE, Garner BC, Sakamoto K. Systemic immune responses in Cytauxzoon felis-infected domestic cats. Am. J. Vet. Res. 2013; 74: 901-9.

Fuchs J, Bauer N, Großendorf E, Lechner J, Neuerer F, Nickel R, Rieker T, Schwedes C, Russell J, DeNicola D, Moritz A. Multicenterstudie zur Retikulozytose bei nichtanämischen Katzen. Tierärztliche Praxis Kleintiere 2016; 44: A1-13, 8-9 (Abstract).

Furman E, Leidinger E, Hooijberg EH, Bauer N, Beddies G, Moritz A. A retrospective study of 1,098 blood samples with anemia from adult cats: frequency, classification, and association with serum creatinine concentration. J. Vet. Intern. Med. 2014; 28: 1391-7.

Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune Hemolytic Anemia. Am. J. Hematol. 2002; 69: 258-71.

Geiger H, Song S, Groom A. Release of red cells from the slowly-exchanging splenic pool after noradrenaline administration. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1976; 54: 477-84.

Geldard AR, Tobin DJ, Cuthbert A. Immature reticulocyte fraction as a useful parameter for blood transfusion assessment in anaemia. Br. J. Biomed. Sci. 2009a; 66: 98.

Geldard AR, Tobin DJ, Cuthbert A. Immature reticulocyte fraction as a useful parameter for blood transfusion assessment in anaemia. Br. J. Biomed. Sci. 2009b; 66: 98-101.

Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. Antioxid. & Redox Signal. 2008; 10: 1923-40.

Giddens Jr W, Labbe R, Swango L, Padgett G. Feline congenital erythropoietic porphyria associated with severe anemia and renal disease. Clinical, morphologic, and biochemical studies. Am. J. Pathol. 1975; 80: 367.

Giger U, Bucheler J, Patterson DF. Frequency and inheritance of A and B blood

types in feline breeds of the United States. *J. Hered.* 1991; 82: 15-20.

Giger U, Bücheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991; 198: 411-8.

Giger U, Gorman NT, Hubler M, Leidinger JI, Leidinger EF, Lubas G, Niini T, Slappendel RJ. Frequencies of feline A and B blood types in Europe. *Anim. Genet.* 1992; 23: 17-8.

Giger U, Casal ML. Feline colostrum-friend or foe: maternal antibodies in queens and kittens. *J. Reprod. Fertil.* 1996; 51: (Suppl) 313-6.

Giger U, Rajpurohit Y, Wang P, Ford S, Kohn B, Niggemeier A, Patterson DF, Beutler E, Henthorn PS. Molecular basis of erythrocyte pyruvate kinase (R-PK) deficiency in cats. *Blood* 1997; 90: (Suppl) 5b.

Giger U, Wang P, Boyden M. Familial methemoglobin reductase deficiency in domestic shorthair cats. *Feline Practice* 1999; 31: 14.

Giger U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders 2000a: 1784-804.

Giger U. Hereditary erythrocyte disorders. In: *Kirk's Current Therapy*. Saunders WB, ed. Philadelphia: 2000b: 414-20.

Giger U. Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St Louis: Saunders 2005: 1886.

Githens TS, Butz LW. Venoms of North American snakes and their relationship. *The Journal of Immunology* 1929; 16: 71-80.



Gitzelmann R, Bosshard N, Superti-Furga A, Spycher M, Briner J, Wiesmann U, Lutz H, Litschi B. Feline Mucopolysaccharidosis VII Due to  $\beta$ -glucuronidase Deficiency. *Veterinary Pathology Online* 1994; 31: 435-43.

Goncalo AP, Barbosa IL, Campilho F, Campos A, Mendes C. Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. *Transplant. Proc.* 2011; 43: 241-3.

Gonzalez-Casas R, Jones EA, Moreno-Otero R. Spectrum of anemia associated with chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 4653-8.

Grahn RA, Grahn JC, Penedo MC, Helps CR, Lyons LA. Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency mutation identified in multiple breeds of domestic cats. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 207.

Granat F, Geffre A, Bourges-Abella N, Mortier J, Theron ML, Fauchon E, Braun JP, Trumel C. Feline reference intervals for the Sysmex XT-2000iV and the ProCyte DX haematology analysers in EDTA and CTAD blood specimens. *J. Feline Med. Surg.* 2014; 16: 473-82.

Greco DS. Diagnosis of congenital and adult-onset hypothyroidism in cats. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2006; 21: 40-4.

Greco DS. Hypoadrenocorticism in small animals. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2007; 22: 32-5.

Grindem C, Perman V, Stevens J. Morphological classification and clinical and pathological characteristics of spontaneous leukemia in 10 cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1985; 21: 227-36.

Griot-Wenk ME, Giger U. The AB blood group system in wild felids. *Anim. Genet.* 1999; 30: 144-7.

Gurkan M, Arikan Ş, Ozaytekin E, Dodurka T. Titres of alloantibodies against A and B blood types in non-pedigree domestic cats in Turkey: assessing the transfusion reaction risk. *J. Feline Med. Surg.* 2005; 7: 301-5.

Gurnee CM, Drobatz KJ. Zinc intoxication in dogs: 19 cases (1991–2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007; 230: 1174-9.

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013; 27: 41-53.

Haiden N, Schwindt J, Cardona F, Berger A, Klebermass K, Wald M, Kohlhauser-Vollmuth C, Jilma B, Pollak A. Effects of a Combined Therapy of Erythropoietin, Iron, Folate, and Vitamin B12 on the Transfusion Requirements of Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 2006; 118: 2004-13.

Harley R, Helps C, Harbour D, Gruffydd-Jones T, Day M. Cytokine mRNA Expression in Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6: 471-8.

Hartmann K. Feline Leukemia Virus Infection. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd edn. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Saunders 2006: 105-31.

Hartmann K, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H. Babesiosis in Cats ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2013; 15: 643-6.

Harvey JW, Shields RP, Gaskin JM. Feline myeloproliferative disease. Changing manifestations in the peripheral blood. *Veterinary Pathology Online* 1978; 15: 437-48.

Harvey JW, Wolfsheimer KJ, Simpson CF, French TW. Pathologic sideroblasts and siderocytes associated with chloramphenicol therapy in a dog. *Vet. Clin. Pathol.* 1985; 14: 36-42.

Harvey JW. Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.* 2006; 35: 144-56.

Harvey JW. Understanding Reticulocyte Counts in Cats. *DX Consult* 2008; 1: 16.

Hathaway JE. Feline anemia. *The Veterinary clinics of North America* 1976; 6: 495-510.

Hill AS, O'Neill S, Rogers QR, Christopher MM. Antioxidant prevention of Heinz body formation and oxidative injury in cats. *Am. J. Vet. Res.* 2001; 62: 370-4.

Hisasue M, Okayama H, Okayama T, Suzuki T, Mizuno T, Fujino Y, Naganobu K, Hasegawa A, Watari T, Matsuki N. Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes. *J. Vet. Intern. Med.* 2001; 15: 471-7.

Hisasue M, Nagashima N, Nishigaki K, Fukuzawa I, Ura S, Katae H, Tsuchiya R, Yamada T, Hasegawa A, Tsujimoto H. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. *Int. J. Cancer* 2009; 124: 1133-41.

Holland CT, Canfield PJ, Watson ADJ, Allan GS. Dyserythropoiesis, polymyopathy, and cardiac disease in three related English springer spaniels. *J. Vet. Intern. Med.* 1991; 5: 151-9.

Holzworth J. Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* 1963; 53: 157-60.

Hoover EA, Kociba GJ. Bone lesions in cats with anemia induced by feline leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 53: 1277-84.

Hoover EA, Kociba GJ, Hardy WD, Yohn DS. Erythroid hypoplasia in cats inoculated with feline leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 53: 1271-6.

Hopper CD, Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Crispin SM, Muir P, Harbour DA, Stokes CR. Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *The Veterinary record* 1989; 125: 341-6.

Horvath S, Couto C, Yant K, Kontur K, Bohenko L, Iazbik M, Marín L, Hudson D, Chase J, Frye M. Effects of racing on reticulocyte concentrations in Greyhounds. *Vet. Clin. Pathol.* 2014; 43: 15-23.

Huh J, Moon H, Chung W. Erroneously elevated immature reticulocyte counts in leukemic patients determined using a Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Ann. Hematol.* 2007; 86: 759-62.

Ivanova, Zeller. Müdigkeit und Anämie. *Praxis* 2009; 98: 1463-7.

Jain NC. Demonstration of Heinz bodies in erythrocytes of the cat. *Bulletin of the American Society of Veterinary Clinical Pathologists* 1973; 2: 13-23.

Jain NC. *Essentials of veterinary hematology* Philadelphia: Lea and Febiger 1993: 105-32.

Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.* 2007; 78: 183-205.

Jonas LD, Thrall MA, Weiser MG. Nonregenerative form of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1987; 23: 201-4.

Jones D, Gruffydd-Jones T. The haematological consequences of immune-mediated anaemia in the dog. *Comp. Haematol. Int.* 1991; 1: 83-90.

Just F, Pfister K. Detection frequency of haemoplasma infections of the domestic cat in Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2006; 120: 197-201.

Justin RB, Hohenhaus AE. Hypophosphatemia associated with enteral

alimentation in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 1995; 9: 228-33.

Kakiuchi S, Kobayshi M, Satomi Y, Miura D, Kasahara Y, Kondo S. Flow cytometric analysis of erythropoietic abnormality: changes in the cell maturity index of reticulocytes and retic distribution index are useful as indicators of erythropoietic toxicity in non-clinical studies. *The Journal of Toxicological Sciences* 2006; 31: 111-22.

Kalaidjieva V. Modulation of erythropoiesis in rat bone marrow erythroblastic islands by cyclooxygenase inhibition. *Gen. Pharmacol.* 1999; 32: 423-8.

Kaneko JJ. The porphyrias and the porphyrinurias. In: Schalm's Veterinary Hematology. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2000: 1002-7.

Kaplan SM, Rothmann SA, Camiscoli JF, Gordon AS. Loss with age in the capacity for erythropoietin production by extrarenal tissues in rats. *J. Med.* 1975; 6: 136-42.

Kearns SA, Ewing P. Causes of Canine and Feline Pancytopenia. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 2006; 28: 122-34.

Kier AB, Wagner JE, Kinden DA. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *J. Comp. Pathol.* 1987; 97: 415-32.

King DJ, Brunton J, Barr RD. The influence of corticosteroids on human erythropoiesis. An in vivo study. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1988; 10: 313-5.

Kobayashi K. Onion poisoning in the cat. *Feline practice* 1981; 11: 22-7.

Kocan AA, Kocan KM, Blouin EF, Mukolwe SW. A redescription of schizogony of *Cytauxzoon felis* in the domestic cat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992; 653: 161-7.

Koepke JA. Reticulocyte counting. In: Practical Laboratory Hematology, 5th edn. Koepke JA, ed. Churchill Livingstone, NY: 1991: 99-107.

Koepke JA. Update on reticulocyte counting. Laboratory Medicine 1999; 30: 339-43.

Kohn B, Goldschmidt MH, Hohenhaus AE, Giger U. Anemia, splenomegaly, and increased osmotic fragility of erythrocytes in Abyssinian and Somali cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2000; 217: 1483-91.

Kohn B. Erythrozytenstudien bei gesunden und anämischen Katzen: Physiologische Besonderheiten des felines Hämoglobins - Differentialdiagnose von Anämien bei der Katze unter besonderer Berücksichtigung hämolytischer Anämien - Blutgruppenbestimmung und Transfusionsmedizin bei der Katze.: Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin 2001:

Kohn B, Weingart C, Giger U. Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. J. Feline Med. Surg. 2003; 5: 295-304.

Kohn B, Fumi C, Seng A, Giger U. Anemia due to erythrocytic pyruvate kinase deficiency and its incidence in Somali and Abyssinian cats in Germany. Kleintierpraxis 2005; 50: 305-12.

Kohn B, Weingart C, Eckmann V, Ottenjann M, Leibold W. Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia in 19 Cats: Diagnosis, Therapy, and Outcome (1998–2004). J. Vet. Intern. Med. 2006; 20: 159-66.

Kohn B, Fumi C. Clinical course of pyruvate kinase deficiency in Abyssinian and Somali cats. J. Feline Med. Surg. 2008; 10: 145-53.

Kovalkovičová N, Šutiaková I, Pistl J, Šutiak V. Some food toxic for pets. Interdisciplinary toxicology 2009; 2: 169-76.

Kraft W, Dürr UM, Fürll M, Bostedt H, Heinritzi K. Hämatologie (Haematology). In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 5th edn. Kraft W, Dürr UM, eds. Stuttgart, BW: Schattauer 1999: 43-77.

Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasit. Vectors 2014; 7: 30.

Kruse BD, Unterer S, Horlacher K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. J. Vet. Intern. Med. 2010; 24: 1271-6.

Kuehn NF, Gaunt SD. Hypocellular marrow and extramedullary hematopoiesis in a dog: hematologic recovery after splenectomy. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1986; 188: 1313-5.

Langston CE, Reine NJ, Kittrell D. The use of erythropoietin. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2003; 33: 1245-60.

Lascelles BDX, Court MH, Hardie EM, Robertson SA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cats: a review. Veterinary anaesthesia and analgesia 2007; 34: 228-50.

Lenard ZM, Foster SF, Tebb AJ, Russell NJ, O'Hara AJ, Lester NV. Lymphangiosarcoma in two cats. J. Feline Med. Surg. 2007; 9: 161-7.

Lenox C, Bauer J. Potential Adverse Effects of Omega-3 Fatty Acids in Dogs and Cats. J. Vet. Intern. Med. 2013; 27: 217-26.

Lilliehook I, Tvedten H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. Vet. Clin. Pathol. 2009; 38: 163-74.

Linenberger ML, Deng T. The effects of feline retroviruses on cytokine

expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999; 72: 343-68.

Macdougall IC. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney Int.* 2001; 59: 67-72.

Maede Y. Studies on feline haemobartonellosis, V: Role of the spleen in cats infected with *Haemobartonella felis*. *Japanese Journal of Veterinary Science* 1978; 40: 141-6.

Maede Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. *Japanese Journal of Veterinary Science* 1980; 42: 281-8.

Malgor LA, Valsecia ME, Verges EG, de Markowsky EE. Enhancement of erythroid colony growth by triiodothyronine in cell cultures from bone marrow of normal and anemic rats with chronic renal failure. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 1995; 45: 79-86.

Mallet M. Refeeding syndrome. *Age Ageing* 2002; 31: 65-6.

Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling Pathways in Cartilage Repair. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 8667-98.

Marion RS, Smith JE. Survival of erythrocytes after autologous and allogeneic transfusion in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; 183: 1437-9.

Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Singh S. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int. J. Lab. Hematol.* 2007; 29: 341-6.

Marsh JCW, Geary CG. Is aplastic anemia a pre-leukaemic disorder? *Br. J. Haematol.* 1991; 77: 447-52.



Matteucci D, Baldinotti F, Mazzetti P, Pistello M, Bandecchi P, Ghilarducci R, Poli A, Tozzini F, Bendinelli M. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 494-501.

Matthews NS, Brown RM, Barling KS, Lovering SL, Herrig BW. Repetitive propofol administration in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2004; 40: 255-60.

McGuill MW, Rowan AN. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR J.* 1989; 31: 5-20.

McNamara P, Barr S, Erb H, Barlow L. Hematologic, hemostatic, and biochemical effects in cats receiving an oral chondroprotective agent for 30 days. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine* 1999; 1: 108-17.

Meichner K, Kruse DB, Hirschberger J, Hartmann K. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. *The Veterinary Record* 2012; 171: 348.

Mentzer WC, Wagner GM, Petz LD. *The hereditary hemolytic anemias* New York, NY: Churchill Livingstone 1989: 267-318.

Miller E. Immune-Mediated Hemolytic Anemia. In: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier 2009: 266-71.

Monauni T, Zenti MG, Cretti A, Daniels MC, Targher G, Caruso B, Caputo M, McClain D, Del Prato S, Giaccari A. Effects of Glucosamine Infusion on Insulin Secretion and Insulin Action in Humans. *Diabetes* 2000; 49: 926-35.

Mooney CT. Feline hyperthyroidism. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2001; 31: 963-83.

Moritz A, Fickenschner Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Veterinary Clinical Pathology* 2004; 33: 32-8.

Moritz A, Schwendenwein I, Kraft W. Hämatologie (Haematology). In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 7th edn. Moritz A, ed. Stuttgart, BW: Schattauer 2014: 79-156.

Morkis IV, Farias MG, Rigoni LD, Scotti L, Gregianin LJ, Daudt LE, Silla LM, Paz AA. Assessment of immature platelet fraction and immature reticulocyte fraction as predictors of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37: 259-64.

Mucke V, Mucke MM, Raine T, Bettenworth D. Diagnosis and treatment of anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* 2017; 30: 15-22.

Muirden A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Vet. Rec.* 2002; 150: 621-5.

Mulholland SG, Sant GR, Hanno P, Staskin DR, Parsons L. Pentosan Polysulfate Sodium for Therapy of Interstitial Cystitis: A double-Blind Placebo-Controlled Clinical Study. *Urology* 1990; 35: 552-8.

Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N, Cornet Y, Chatelain C, Dogne JM, Chatelain B. Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann. Hematol.* 2011; 90: 759-68.

Murphy CJ, Canton DC, Bellhorn RW, Okihira M, Cahoon B, Dufort R. Disseminated adenocarcinoma with ocular involvement in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989; 195: 488-91.

Myers S, Wiks K, Giger U. Macrocytic anemia caused by naturally-occurring folate-deficiency in the cat. *Vet. Pathol.* 1995; 32: 547.

Naigamwalla DZ, Webb JA, Giger U. Iron deficiency anemia. *Can. Vet. J.* 2012; 53: 250-6.

Najman A, Kobari L, Khoury E, Baillou CL, Lemoine F, Guigon M. Suppression of Normal Hematopoiesis during Acute Leukemias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1991; 628: 140-7.

Nangaku M, Eckardt K-U. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J. Mol. Med.* 2007; 85: 1325-30.

Nebe CT, Diem H, Heimpel H. Current aspects of reticulocyte analysis. *Laboratoriumsmedizin-Journal of Laboratory Medicine* 2010; 34: 295-304.

Nebe T, Bentzien F, Bruegel M, Fiedler GM, Gutensohn K, Heimpel H, Krebs N, Ossendorf M, Schuff-Werner P, Stamminger G. Multizentrische Ermittlung von Referenzbereichen für Parameter des maschinellen Blutbildes. *LaboratoriumsMedizin* 2011; 35: 3-28.

Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM\*. *J. Vet. Intern. Med.* 2002; 16: 309-15.

Nelson AW. Hypovolemic shock. *Vet. Clin. North Am.* 1976; 6: 187-92.

Nietfeld JC, Pollock C. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 2002; 38: 607-10.

Noronha JFA, De Souza CA, Vigorito AC, Aranha FJP, Zulli R, Miranda ECM, Grotto HZW. Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Lab. Haematol.*

2003; 25: 47-54.

O'Brien TQ, Clark-Price SC, Evans EE, Di Fazio R, McMichael MA. Infusion of a lipid emulsion to treat lidocaine intoxication in a cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2010; 237: 1455-8.

Ottenjann M, Weingart C, Arndt G, Kohn B. Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax, or fat necrosis. J. Vet. Intern. Med. 2006; 20: 1143-50.

Paltrinieri S. The diagnostic approach to anaemia in the dog and cat. JHVMS 2014; 65: 149-64.

Papasouliotis K, Cue S, Crawford E, Pinches M, Dumont M, Burley K. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. Veterinary clinical pathology 2006; 35: 295-302.

Patel RT, Caceres A, French AF, McManus PM. Multiple myeloma in 16 cats: a retrospective study. Vet. Clin. Pathol. 2005; 34: 341-52.

Pattullo KM, Kidney BA, Taylor SM, Jackson ML. Reticulocytosis in nonanemic dogs: increasing prevalence and potential etiologies. Vet. Clin. Pathol. 2015; 44: 26-36.

Pearl JM, Ritchie WP, Gilsdorf RB, Delaney JP, Leonard AS. Hypothalamic Stimulation and Feline Gastric Mucosal Cellular Populations: Factors in the Etiology of the Stress Ulcer. JAMA 1966; 195: 281-4.

Pecoraro MR, Tomonaga K, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Sugita S, Tohya Y, Kai C, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. J. Gen. Virol. 1996; 77 ( Pt 9): 2031-5.

Pedersen NC. Feline leukemia virus infection. In: Feline infectious diseases. Pedersen NC, ed. Santa Barbara, CA: American Veterinary Publications 1988: 83.

Penzhorn BL, Schoeman T, Jacobson L. Feline babesiosis in South Africa: a review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1026: 183-6.

Perkins PC, Grindem CB, Cullins LD. Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56: 1564-9.

Perman V, Schall WB. Diseases of the red blood cells. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Philadelphia: Saunders Co. 1983: 567-92.

Peters AM. Splenic blood flow and blood cell kinetics. *Clin. Haematol.* 1983; 12: 421.

Peterson JL, Couto CG, Wellman ML. Hemostatic Disorders in Cats: A Retrospective Study and Review of the Literature. *J. Vet. Intern. Med.* 1995; 9: 298-303.

Peterson ME, Hurvitz AI, Leib MS, Cavanagh PG, Dutton RE. Propylthiouracil-associated hemolytic anemia, thrombocytopenia, and antinuclear antibodies in cats with hyperthyroidism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984; 184: 806-8.

Peterson ME, Kintzer PP, Hurvitz AI. Methimazole treatment of 262 cats with hyperthyroidism. *J. Vet. Intern. Med.* 1988; 2: 150-7.

Peterson ME. Feline focus: Diagnostic testing for feline thyroid disease: hyperthyroidism. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 2013; 35: E1-6.

Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1 $\alpha$  in osteoarthritis. *Int. Orthop.* 2005; 29: 6-9.

Pierre RV. Reticulocytes. Their usefulness and measurement in peripheral blood. Clin. Lab. Med. 2002; 22: 63-79.

Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. Clin. Chem. Lab. Med. 2010; 48: 1369-80.

Prins M, Van Leeuwen MW, Teske E. Stability and reproducibility of ADVIA 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CH (R)) in the diagnosis of iron deficiency. Tijdschr. Diergeneeskd. 2009: 272-8.

Quackenbush SL, Donahue PR, Dean GA, Myles MH, Ackley CD, Cooper MD, Mullins JJ, Hoover EA. Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. J. Virol. 1990; 64: 5465-74.

Raja-Sabudin RZ, Othman A, Ahmed-Mohamed KA, Ithnin A, Alauddin H, Alias H, Abdul-Latif Z, Das S, Abdul-Wahid FS, Hussin NH. Immature reticulocyte fraction is an early predictor of bone marrow recovery post chemotherapy in patients with acute leukemia. Saudi Med. J. 2014; 35: 346-9.

Randolph JF, Scarlett JM, Stokol T, Saunders KM, MacLeod JN. Expression, bioactivity, and clinical assessment of recombinant feline erythropoietin. Am. J. Vet. Res. 2004; 65: 1355-66.

Rankin EB, Wu C, Khatri R, Wilson TL, Andersen R, Araldi E, Rankin AL, Yuan J, Kuo CJ, Schipani E, Giaccia AJ. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. Cell 2012; 149: 63-74.

Rao K, Harford J, Rouault T, McClelland A, Ruddle F, Klausner R. Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. Mol. Cell. Biol. 1986; 6: 236-40.

Raskin RE. Myelopoiesis and myeloproliferative disorders. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1996; 26: 1023-42.

Rauf SE, Khan SA, Ali N, Afridi NK, Haroon M, Arslan A. Immature Reticulocyte Fraction and Absolute Neutrophil Count as Predictor of Hemopoietic Recovery in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia on Remission Induction Chemotherapy. Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology 2016; 33: 131-4.

Reagan WJ, Vap LM, Weiser MG. Flow cytometric analysis of feline reticulocytes. Vet. Pathol. 1992; 29: 503-8.

Rebar A, Hahn F, Halliwell W, DeNicola D, Benjamin S. Microangiopathic Hemolytic Anemia Associated with Radiation-Induced Hemangiosarcomas. Veterinary Pathology Online 1980; 17: 443-54.

Reed N, Gunn-Moore D, Simpson K. Cobalamin, folate and inorganic phosphate abnormalities in ill cats. J. Feline Med. Surg. 2007; 9: 278-88.

Riley RS, Ben-Ezra JM, Goel R, Tidwell A. Reticulocytes and reticulocyte enumeration. J. Clin. Lab. Anal. 2001; 15: 267-94.

Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8 edn Stuttgart: Enke 2007: 393–558.

Rothmann SA, Savage RA, Paul P. Erythropoietin-dependent erythrocytosis associated with hepatic angiosarcoma. J. Surg. Oncol. 1982; 20: 105-8.

Ruland K, Fischer A, Reese S, Zahn K, Matis U, Hartmann K. Portosystemic shunts in cats-evaluation of six cases and a review of the literature. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2008; 122: 211-8.

Rumbeiha WK, Oehme FW. Methylene blue can be used to treat

methemoglobinemia in cats without inducing Heinz body hemolytic anemia. *Vet. Hum. Toxicol.* 1992; 34: 120-2.

Rust MK, Dryden MW. The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annu. Rev. Entomol.* 1997; 42: 451-73.

Rust MK. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. *Trends Parasitol.* 2005; 21: 232-6.

Santoro D, Pease A, Linder KE, Olivry T. Post-traumatic peripheral arteriovenous fistula manifesting as digital haemorrhages in a cat: diagnosis with contrast-enhanced 3D CT imaging. *Veterinary dermatology* 2009; 20: 206-13.

Sassnau R. Epidemiologische Untersuchung zur Prävalenz der feline Hyperthyreose in einem deutschen Großstadtbereich. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 2006; 34: 450-7.

Sato S, Kozuma Y, Hasegawa Y, Kojima H, Chiba S, Ninomiya H. Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int. J. Lab. Hematol.* 2010; 32: e137-43.

Savary K, Price GS, Vaden SL. Hypercalcemia in cats: a retrospective study of 71 cases (1991–1997). *J. Vet. Intern. Med.* 2000; 14: 184-9.

Schäfer H. Constructing a cut-off point for a quantitative diagnostic test. *Stat. Med.* 1989; 8: 1381-91.

Schechter RD, Schalm OW, Kaneko JJ. Heinz body hemolytic anemia associated with the use of urinary antiseptics containing methylene blue in the cat. *Amer Vet Med Assoc J* 1973;

Schittenhelm A. Schädigungen durch radioaktive Strahlen, ihre Beurteilung und



Behandlung. In: Lehrbuch der Inneren Medizin Berlin, Heidelberg: Springer 1939: 1745-61

Schoeman T, Lobetti RG, Jacobson LS, Penzhorn BL. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. J. S. Afr. Vet. Assoc. 2001; 72: 4-11.

Schultheiss P, Gardner S, Owens J, Wenger D, Thrall M. Mucopolysaccharidosis VII in a Cat. Veterinary Pathology Online 2000; 37: 502-5.

Schultheiss PC. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. J. Vet. Diagn. Invest. 2004; 16: 522-6.

Seki A, Abe M. Scanning electron microscopic studies on the microvascular system of the spleen in the rat, cat, dog, pig, horse and cow. The Japanese Journal of Veterinary Science 1985; 47: 237-49.

Semmelrock M, Raggam R, Amrein K, Avian A, Schallmoser K, Lanzer G, Semmelrock H, Pruessner F, Berghold A, Rohde E. Reticulocyte hemoglobin content allows early and reliable detection of functional iron deficiency in blood donors. Clin. Chim. Acta 2012; 413: 678-82.

Sen S, Hoffman GC, Stowe NT, Smeby RR, Bumpus FM. Erythrocytosis in Spontaneously Hypertensive Rats. J. Clin. Invest. 1972; 51: 710.

Shaw SE, Kenny MJ, Tasker S, Birtles RJ. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. Vet. Microbiol. 2004; 102: 183-8.

Shelton GH, Linenberger ML, Abkowitz JL. Hematologic abnormalities in cats seropositive for feline immunodeficiency virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1991; 199: 1353-7.

Shelton GH, Linenberger ML. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)* 1995; 10: 220-33.

Shimoda T, Shiranaga N, Mashita T, Hasegawa A. A hematological study on thirteen cats with myelodysplastic syndrome. *J. Vet. Med. Sci.* 2000; 62: 59-64.

Shuying L, Wen C, Zhiqing W. Effect of Taurine on Anti-anoxia and Erythrocyte Protection of Mice. *Journal of Ningxia University (Natural Science Edition)* 2007; 3: 016.

Sica S, Sora F, Laurenti L, Piccirillo N, Salutari P, Chiusolo P, Onofrio G, Leone G. Highly fluorescent reticulocyte count predicts haemopoietic recovery after immunosuppression for severe aplastic anaemia. *Clin. Lab. Haematol.* 1999; 21: 387-9.

Sietsma H, Kamps WA, Dontje B, Hendriks D, Kok JW, Vellenga E, Nijhof W. Leukemia-induced bone marrow depression: effects of gangliosides on erythroid cell production. *Int. J. Cancer* 1999; 82: 92-7.

Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Vet. Parasitol.* 2011; 181: 48-60.

Spangler WL, Kass PH. Splenic myeloid metaplasia, histiocytosis, and hypersplenism in the dog (65 cases). *Veterinary Pathology Online* 1999; 36: 583-93.

Sparkes AH, Hopper CD, Millard WG, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline immunodeficiency virus infection clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. *J. Vet. Intern. Med.* 1993; 7: 85-90.

Spink RR, Malvin RL, Cohen BJ. Determination of erythrocyte half life and blood volume in cats. *Am. J. Vet. Res.* 1966; 27: 1041-3.

Steinrigl A, Klein D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 1301-7.

Stohlmann JR F. Some aspects of erythropoiesis. *Semin. Hematol.* 1964; 4: 304-14.

Stonehewer J, Tasker S. Hypoadrenocorticism in a cat. *J. Small Anim. Pract.* 2001; 42: 186-90.

Strickland KN. Canine and feline caval syndrome. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 1998; 13: 88-95.

Stützer B, Müller F, Majzoub M, Lutz H, Greene CE, Hermanns W, Hartmann K. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2010; 24: 192-7.

Swann JW, Szladovits B, Glanemann B. Demographic Characteristics, Survival and Prognostic Factors for Mortality in Cats with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J. Vet. Intern. Med.* 2016; 30: 147-56.

Sysmex (2008) Customer information, software-info XT-IV series software version 00-09.

Tanke H, Van Vianen P, Emiliani F, Neuteboom I, de Vogel N, Tates A, de Bruijn E, van Oosterom A. Changes in erythropoiesis due to radiation or chemotherapy as studied by flow cytometric determination of peripheral blood reticulocytes. *Histochemistry* 1986; 84: 544-8.

Tanke HJ, Rothbarth PH, Vossen J, Koper G, Ploem JS. Flow Cytometry of Reticulocytes Applied to Clinical Hematology. *Blood* 1983; 61: 1091-7.

Tasker S, Binns SH, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Helps CR, Jensen WA, Olver CS, Lappin MR. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk

factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2003; 152: 193-8.

Tasker S, Caney SM, Day MJ, Dean RS, Helps CR, Knowles TG, Lait PJ, Pinches MD, Gruffydd-Jones TJ. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. *Vet. Microbiol.* 2006; 117: 169-79.

Telford RD, Sly GJ, Hahn AG, Cunningham RB, Bryant C, Smith JA. Footstrike is the major cause of hemolysis during running. *J. Appl. Physiol.* 2003; 94: 38-42.

Terry A, Fulton R, Stewart M, Onions DE, Neil JC. Pathogenesis of Feline Leukemia Virus T17: Contrasting Fates of Helper, v-myc, and v-tcr Proviruses in Secondary Tumors. *J. Virol.* 1992; 66: 3538-49.

Testa NG, Onions D, Jarrett O, Frassoni F, Eliason JF. Haemopoietic colony formation (BFU-E, GM-CFC) during the development of pure red cell hypoplasia induced in the cat by feline leukaemia virus. *Leuk. Res.* 1983; 7: 103-16.

Thews G, Vaupel P. *Vegetative Physiologie*, 2 edn Heidelberg: Springer-Verlag 1990: 13-5.

Thoday K, Mooney C. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *The Veterinary record* 1992a; 131: 257-64.

Thoday KL, Mooney CT. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *The Veterinary record* 1992b; 131: 257-64.

Tholen I, Weingart C, Kohn B. Concentration of D-dimers in healthy cats and sick cats with and without disseminated intravascular coagulation (DIC). *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11: 842-6.

Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I.

Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. Br. J. Haematol. 2013; 161: 639-48.

Thomas L. Hämatologie. In: Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 8th edn. Thomas L, ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft 2012: 811-944.

Thompson JC. Myelofibrosis in a cat (abstract). N. Z. Vet. J. 2003; 51: 46.

Thornton RD, Pamela L, Borghaei RC, PEASE EA, Jaime C, Mochan E. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. Biochem. J. 2000; 350: 307-12.

Thrall MA, Weiser G, Jain N. Laboratory evaluation of bone marrow. Veterinary hematology and clinical chemistry 2004: 147-78.

Thrall MA, Weiser G, Allison RA, Campbell TW. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, 2nd edn Ames, Iowa: J Wiley & Sons 2012: 75-80.

Tomsa K, Steffen F, Glaus T. Lebensbedrohliche Stoffwechselstörungen nach Applikation eines Natriumphosphathaltigen Klistiers bei Hund und Katze. Praktischer Tierarzt 2001; 82: 682.

Torres A, Sanchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martin C, Valls C, Nevado L, Rodriguez A, Casano J, Martinez F, Gomez P. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 2001; 86: 24-9.

Torres Gomez A, Casano J, Sanchez J, Madrigal E, Blanco F, Alvarez MA. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. Clin. Lab. Haematol. 2003; 25: 283-8.

Travlos GS. Histopathology of Bone Marrow. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34: 566-98.

Tvedten H, Weiss D. Classification and laboratory evaluation of anemia. In: Schalm's veterinary hematology, 5th edn. Feldman BF, Zink JG, Jain NC, eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000: 143-50.

Tvedten H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Ames: John Wiley & Sons 2010: 152-61.

Tvedten H. What is your diagnosis? Discrepancy between Sysmex XT-2000iV reticulocyte count and polychromasia. *Vet. Clin. Pathol.* 2011; 40: 275-6.

Tvedten HW. Morphologic classification of anemia. *Vet. Clin. Pathol.* 1999; 28: 80-2.

Tzavaras T, Stewart M, McDougall A, Fulton R, Testa N, Onions DE, Neil JC. Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 343-54.

Vaden SL, Wood PA, Ledley FD, Cornwell PE, Miller RT, Page R. Cobalamin deficiency associated with methylmalonic acidemia in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992; 200: 1101-3.

Valenviano AC, Decker LS, Cowell RL. Interpretation of Feline Leukocyte Responses. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Ames, Iowa: John Wiley & Sons 2010: 335-44.

Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2006; 63: 414-34.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses

arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 1998; 243: 150-7.

Villamor N, Kirsch A, Huhn D, Vives-Corrons JL, Serke S. Interference of blood leucocytes in the measurements of immature red cells (reticulocytes) by two different (semi-) automated flow-cytometry technologies. *Clin. Lab. Haematol.* 1996; 18: 89-94.

Walker D, Cowell R. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995; 206: 1363-5.

Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, Houwen B. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 736-9.

Watson ADJ, Moore AS, Helfand SC. Primary erythrocytosis in the cat: Treatment with hydroxyurea. *J. Small Anim. Pract.* 1994; 35: 320-5.

Watson C, Runge W, Taddeini L, Bossenmater I, Cardinal R. A suggested control gene mechanism for the excessive production of types I and III porphyrins in congenital erythropoietic porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1964; 52: 478-85.

Webb J, Chary P, Northrup N, Almy F. Erythrophagocytic multiple myeloma in a cat. *Vet. Clin. Pathol.* 2008; 37: 302-7.

Weber NA, Tebeau CS. An unusual presentation of multiple myeloma in two cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1998; 34: 477-83.

Weinstein NM, Blais MC, Harris K, Oakley DA, Aronson LR, Giger U. A newly recognized blood group in domestic shorthair cats: the Mik red cell antigen. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; 21: 287-92.

Weiser MG, Kociba GJ. Sequential changes in erythrocyte volume distribution

and microcytosis associated with iron deficiency in kittens. *Veterinary Pathology Online* 1983a; 20: 1-12.

Weiser MG, Kociba GJ. Erythrocyte macrocytosis in feline leukemia virus associated anemia. *Veterinary Pathology Online* 1983b; 20: 687-97.

Weiss DJ, Krehbiel JD, Lund JE. Studies of the pathogenesis of anemia of inflammation: mechanism of impaired erythropoiesis. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44: 1832-5.

Weiss DJ. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Vet. Clin. Pathol.* 1984; 13: 27-31.

Weiss DJ, Klausner JS. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. *Veterinary Pathology Online* 1988; 25: 450-5.

Weiss DJ, McClay CB. Studies on the pathogenesis of the erythrocyte destruction associated with the anemia of inflammatory disease. *Vet. Clin. Pathol.* 1988; 17: 90-3.

Weiss DJ, Evanson OA. A retrospective study of feline pancytopenia. *Comparative Haematology International* 2000; 10: 50-5.

Weiss DJ. Aplastic anemia. In: Schalm's *Veterinary Hematology* 5th edn. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. Lippincott: Williams & Wilkins 2000: 212-5.

Weiss DJ. Aplastic anemia in cats - clinicopathological features and associated disease conditions 1996-2004. *J. Feline Med. Surg.* 2006a; 8: 203-6.

Weiss DJ. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996–2004). *J. Vet.*



Intern. Med. 2006b; 20: 955-61.

Weiss DJ. Evaluation of dysmyelopoiesis in cats: 34 cases (1996–2005). J. Am. Vet. Med. Assoc. 2006c; 228: 893-7.

Weiss DJ. Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. J. Comp. Pathol. 2008; 138: 46-53.

Weiss DJ. Nonregenerative Anemias. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis, Missouri: Elsevier 2009:

Weiss DJ. Iron and Copper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Ames, Iowa: John Wiley & Sons 2010: 167-71.

Weissenbacher S, Riond B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Evaluation of a novel haematology analyser for use with feline blood. Vet. J. 2011; 187: 381-7.

Weissert D. Lasergestützte Erythrozytenanalyse (ADVIA® 120 und LaserCyte®) bei Hund und Katze mit Auswertung der Erythrozytenmorphologie. Diss. med. vet. 2011. Justus-Liebig-University Giessen.

Wells DA, Daigneault-Creech CA, Simrell CR. Effect of iron status on reticulocyte mean channel fluorescence. Am. J. Clin. Pathol. 1992; 97: 130-4.

Werner LL, Gorman NT. Immune-mediated disorders of cats. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1984: 1039-64.

White C, Reine N. Feline Nonregenerative Anemia: Diagnosis and Treatment. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 2009; 31: E1-11.

Willard MD, Zerbe CA, Schall WD, Johnson C, Crow SE, Jones R. Severe

hypophosphatemia associated with diabetes mellitus in six dogs and one cat. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1987; 190: 1007-10.

Willard MD, Tvedten H. Veränderungen des roten Blutbilds. In: Labordiagnostik in der Kleintierpraxis, 1st edn. Fischer U, ed. München, Bayern: Elsevier 2006: 58-84.

Wintz H, Wittenbeck F. Die Veränderungen des Blutbildes nach Röntgenstrahleneinwirkung. In: Klinik der gynäkologischen Röntgentherapie: Springer 1935: 879-900.

Withrow SJ, Vail DM. Feline Lymphoma and Leukemia. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4th edn. Vail DM, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier 2007: 638-52.

Xu Y, Yang W, Liao L, Deng Z, Qiu Y, Chen W, Lin F. Mean reticulocyte volume: a specific parameter to screen for hereditary spherocytosis. Eur. J. Haematol. 2016; 96: 170-4.

Yamada T, Nagai Y, Matsuda M. Changes in serum immunoglobulin values in kittens after ingestion of colostrum. Am. J. Vet. Res. 1991; 52: 393-6.

Yuri K, Nakata K, Katae H, Yamamoto S, Hasegawa A. Distribution of uropathogenic virulence factors among Escherichia coli strains isolated from dogs and cats. The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science 1998; 60: 287-90.

Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. The EMBO journal 1998; 17: 5085-94.

Zulty JC, Kociba GJ. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1990; 196: 907-10.



## **IX. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich bei allen Menschen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben, recht herzlich bedanken.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herr Priv.-Doz. Dr. Sven Reese, bedanken, der mich bei der Anfertigung der Dissertation hervorragend beraten hat. Seine fachliche Kompetenz und Hilfestellung bei sämtlichen statistischen Auswertungen waren mir eine große Stütze.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Hartmann bedanken, die mir die tierärztliche Tätigkeit an der Medizinischen Kleintierklinik und damit diese Doktorarbeit grundsätzlich ermöglicht hat.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Vera Geisen, die mich bei der Anfertigung der Dissertation ebenfalls betreut hat.

Auch danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. Karin Weber für die Unterstützung in ihrem Fachgebiet der Laboratoriumsdiagnostik.

Bei allen Labormitarbeitern, insbesondere Herrn Holzheu, Frau Mirbeth und Frau Baunoch bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Sammlung und Bearbeitung meiner Blutwerte und Blutausstriche.

Herzlich gedankt sei Frau PhD. Palic für die äußerst wertvollen und akribischen Ratschläge zu der Beurteilung und Auszählung feline Blutzellen.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Medizinischen Kleintierklinik danke ich für die schöne und lehrreiche gemeinsame Zeit.

Auch bei allen meinen Freunden möchte ich mich besonders bedanken, da sie mir zugehört haben und mich auf wunderbare Weise motivieren konnten.

Vielen lieben Dank an meine Familie - und der größte Dank sei an meinen Freund gerichtet, ohne dessen liebevolle und großartige Unterstützung, diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.